ENCYCLOPÉDIE SCIENTIFIQUE
PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DU Dr TOULOUSE

BIBLIOTHÈQUE DE PHYSIOLOGIE
ET DE PATHOLOGIE VÉGÉTALES

DIRECTEUR
Prof. L. MANGIN

Nutrition de la Plante

Cycle de l'Azote

PAR
LE PROFESSEUR M. MOLLIARD

GASTON DOIN, ÉDITEUR A PARIS

Gaston DOIN, Editeur, 8, place de l'Odéon, PARIS, 6e

ENCYCLOPÉDIE SCIENTIFIQUE

Publiée sous la direction du Dr TOULOUSE

BIBLIOTHÈQUE
DE PHYSIOLOGIE & DE PATHOLOGIE VÉGÉTALES

Directeur : **L. MANGIN**

Membre de l'Institut

Directeur du Muséum d'Histoire naturelle

La Physiologie végétale débarrassée de l'étude des mécanismes si compliqués, qui chez les animaux préparent l'exercice des fonctions fondamentales, paraissait destinée, d'après un physiologiste éminent, à suivre *pede claudo* la physiologie animale.

Née d'hier, cette partie de la science, sous l'influence de la nécessité d'une production végétale intense, a d'abord été confinée dans l'étude des rapports de la plante avec le sol et dans celle des phénomènes de croissance, intimement liés à la nutrition. La physiologie végétale a bientôt abandonné cet horizon étroit, illustré cependant par des chimistes de la plus haute valeur, pour aborder les problèmes les plus captivants de la biologie générale.

C'est d'abord, depuis les découvertes de Thuret et d'Unger sur la motilité de certaines cellules végétales, l'extension des phénomènes de sensibilité et de réactions motrices à tous les végétaux. Les données nou-

velles recueillies sur cette importante question ont eu pour conséquence, par exemple, de substituer à l'explication purement physique des phénomènes de croissance, la conception plus précise qui subordonne les déformations géotropiques aux formes de sensibilité plus ou moins dissociées dans les organes en voie de croissance. Les phénomènes de la reproduction découverts d'abord, par un singulier contraste, chez les cryptogammes avant d'être soupçonnés chez les phanérogames, par Thuret et Bornet, Pringsheim, etc... ont pris une importance considérable avec les belles découvertes de Ikeno et Irase, de Weber, de Navaschine et de Guignard. Enfin les questions d'hérédité et de variation, si magistralement développées par de Vries, offrent à l'attention des chercheurs un merveilleux champ d'observations.

Affranchie de la tutelle qu'on voulait lui imposer, la physiologie végétale est devenue indépendante, elle constitue une section spéciale où l'exposé des problèmes variés qu'elle soulève aujourd'hui doit avoir sa place ; toutefois, la partie relative à la nutrition des végétaux sera réduite, pour éviter les doubles emplois avec la section agricole ou la section de chimie biologique.

L'étude des troubles, apportés dans le développement normal des plantes par la rupture de l'équilibre des fonctions, constitue une section : la Pathologie végétale, annexée à la Physiologie. Ces troubles, qui constituent des maladies plus ou moins graves, peuvent être attribués à des causes diverses et l'on peut distinguer les maladies physiologiques et les maladies parasitaires.

Les premières sont provoquées par des modifications du milieu contre lesquelles la plante est impuissante à se protéger.

Les secondes, plus nombreuses, sont dues à la pénétration plus ou moins complète de deux individus différents. Dans cette vie en commun, on peut observer tous les degrés : depuis la symbiose vraie où les deux individus tirent un bénéfice réciproque de leur association, jusqu'au parasitisme le plus étroit où l'un des deux êtres, le parasite, détermine plus ou moins rapidement la mort de son hôte.

L'importance des maladies d'origine parasitaire, la variété des réactions que le parasite exerce sur son hôte, justifient l'existence de la section de Pathologie végétale.

Les volumes seront publiés dans le format in-16 cartonné ; ils formeront chacun 400 pages environ avec ou sans figures dans le texte Chaque ouvrage se vendra séparément.

Voir à la fin du volume, la liste des Bibliothèques de l'ENCYCLOPÉDIE SCIENTIFIQUE, et celle des volumes publiés.

TABLE DES VOLUMES
ET LISTE DES COLLABORATEURS

PHYSIOLOGIE

1. **Nutrition de la plante. Echanges d'eau et de substances minérales**, par M. MOLLIARD, Doyen de la Faculté des Sciences de Paris.
2. **Nutrition de la plante. Formation des substances ternaires**, par M. MOLLIARD.
3. **Nutrition de la plante. Utilisation des substances ternaires**, par M. MOLLIARD.
4. **Nutrition de la plante. Cycle de l'azote**, par M. MOLLIARD.
5. **Echanges d'énergie chez les végétaux**, par M. MOLLIARD.
6. **Action du milieu inorganique sur les végétaux**, par M. MOLLIARD.
7. **Action du milieu vivant sur les végétaux**, par M. MOLLIARD.
8. **Physiologie de l'espèce**, par M. MOLLIARD.
9. **La biologie florale**, par F. PÉCHOUTRE, docteur ès-sciences, professeur au Lycée Louis-le-Grand.
10. **La reproduction et la sexualité**, par F. PÉCHOUTRE, docteur ès-sciences, professeur au Lycée Louis-le-Grand.

11. **La variation et l'hérédité chez les végétaux**, par L. Blaringhem, chargé de cours à la Sorbonne.
12. **Eléments de tératologie végétale**, par L. Blaringhem, chargé de cours à la Sorbonne.

PATHOLOGIE VÉGÉTALE

1. **Introduction. Symbiose. Commensalisme. Parasitisme. Maladies physiologiques**, par L. Mangin.
2. **Les maladies des céréales.**
3. **Les maladies de la vigne.**
4. **Maladies des arbres fruitiers, des plantes potagères et horticoles.**
5. **Les champignons des arbres des forêts. Mycorhizes. Champignons des bois**, par M. Mangin, inspecteur adjoint des Eaux et Forêts.

ENCYCLOPÉDIE SCIENTIFIQUE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION

du Dr **TOULOUSE**, Directeur de Laboratoire à l'Ecole des Hautes-Etudes

Secrétaire général : **H. PIÉRON**

BIBLIOTHÈQUE DE PHYSIOLOGIE & DE PATHOLOGIE VÉGÉTALES

Directeur : **L. MANGIN**

Membre de l'Institut

Directeur du Muséum d'Histoire naturelle

NUTRITION DE LA PLANTE

IV

1941
Curado
20

Bot.
M.

NUTRITION DE LA PLANTE

CYCLE DE L'AZOTE

PAR

Marin MOLLIARD

MEMBRE DE L'INSTITUT

DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Avec 56 figures dans le texte

222746
12. 5. 28

PARIS
LIBRAIRIE OCTAVE DOIN
GASTON DOIN, ÉDITEUR
8, PLACE DE L'ODÉON, 8

1925

Tous droits réservés

PRÉFACE

Les méthodes d'analyse immédiate, basées sur les propriétés physiques et chimiques des substances constitutives des végétaux, permettent d'isoler celles-ci ; elles sont en nombre considérable, mais viennent se ranger dans un petit nombre de groupes essentiels.

Si tout d'abord, pour une dessiccation appropriée, on enlève *l'eau* de la matière vivante ou protoplasme, on constate que la matière sèche qui reste ne représente plus en moyenne qu'environ 20 p. 100 de la substance fraîche ; celle-ci contenait donc à peu près 80 p. 100 d'eau ; cette teneur est d'ailleurs essentiellement variable avec les différents organes ; certains fruit charnus peuvent renfermer jusqu'à 98 p. 100 d'eau alors que des graines n'en contiennent que 5 p. 100.

Faisons brûler la matière végétale desséchée en présence de l'oxygène de l'air ; les substances organiques sont transformées en gaz qui se dégagent et il reste comme résidu un ensemble de substances minérales qu'on désigne sous le nom de *cendres* ; celles-ci représentent en moyenne le dixième de la matière

sèche. Nous avons envisagé dans ses grands traits l'histoire de l'eau et des substances minérales dans un précédent volume de cette Collection.

Enfin, parmi les matières organiques les plus importantes au point de vue pondéral, on trouve les matières ternaires (sucres, acides organiques, huiles...); elles représentent en effet à peu près les 4/5 de la substance sèche ; nous avons également étudié la manière dont elles se constituent et les transformations qu'elles subissent dans la plante.

Il nous reste à considérer les substances dans la composition chimique desquelles entre l'azote ; nous adopterons à leur égard le même plan que celui qui nous a guidés pour l'histoire des substances ternaires ; nous les envisagerons tout d'abord à l'état statique, nous demandant quelle est leur distribution chez les végétaux et quelles sont leurs principales propriétés physiques et chimiques qui permettent de les reconnaître et de les localiser. Nous verrons ensuite comment elles se constituent dans la plante et quelles sont en particulier les sources d'azote offertes aux végétaux par le milieu extérieur ; puis nous nous occuperons des transformations qu'elles subissent, c'est-à-dire de leur utilisation ; formation et utilisation des substances azotées par les végétaux nous renseigneront sur le rôle important que ceux-ci se trouvent jouer dans le cycle de l'azote dans la nature.

Nous terminerons cet ouvrage en montrant que le phosphore subit, du fait des végétaux, des transformations assez comparables à celles qui se rapportent à l'azote et nous aurons ainsi rempli une première partie de la tâche que nous avons entreprise, celle de

décrire dans leurs grandes lignes les phénomènes de la nutrition présentés par les plantes, en cherchant à concilier, autant qu'il est possible, le besoin de clarté et la nécessité de ne pas négliger quelqu'une des plus importantes questions qui se posent à nous. C'est en effet en pensant avant tout à ceux qui désirent s'initier à la physiologie végétale et en avoir une vue d'ensemble que j'ai écrit dans cette Collection les quatre volumes relatifs aux échanges de matière présentés par les plantes.

NUTRITION DE LA PLANTE

CYCLE DE L'AZOTE

INTRODUCTION

PRÉSENCE ET TAUX DE L'AZOTE CHEZ LES VÉGÉTAUX

L'existence de l'azote dans la matière sèche des végétaux est facile à mettre en évidence par le fait que, fortement chauffée, elle dégage une odeur de corne brûlée, mais surtout par le dégagement d'ammoniaque qui se produit quand on la chauffe au rouge en présence de chaux sodée (Will et Warrentrapp). Une autre méthode consiste à faire agir à chaud sur la matière du sodium (Lassaigne) ; on obtient dans ces conditions la formation de cyanure de sodium dont on peut reconnaître la présence, après dissolution dans l'eau, par la formation de bleu de Prusse, après addition de sulfate ferreux et d'acide chlorhydrique.

Les méthodes qui permettent d'évaluer quantitativement l'azote contenu dans une matière organique, et dont nous ne donnerons ici que le principe, consistent essentiellement à amener cet azote à l'état libre ou à l'état d'ammoniaque dont le dosage est facile. Avec

l'une d'entre elles, celle de Dumas (fig. 1), on brûle la matière en présence d'oxyde de cuivre ; l'azote engagé dans les combinaisons organiques est transformé en azote gazeux ou en l'un de ses oxydes ; ceux-ci sont à leur tour réduits par du cuivre métallique porté au

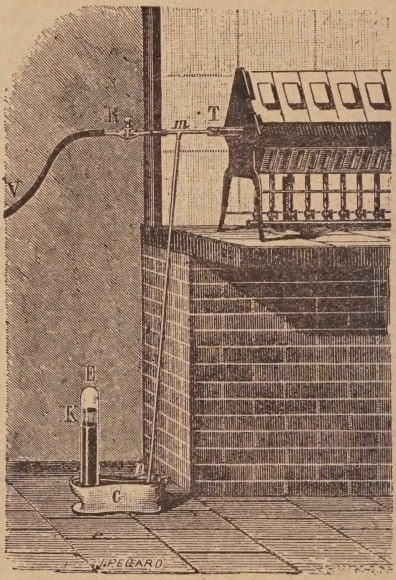


Fig. 1. — Appareil de Dumas pour le dosage de l'azote total.

rouge à l'état d'azote gazeux ; le gaz carbonique qui se dégage en même temps est absorbé par de la potasse, l'eau formée se condense et il suffit d'évaluer l'azote en volume. La réaction de Will et Warrentrapp, qui permet de mettre en évidence la présence d'azote, peut être utilisée également au dosage de ce corps à

l'état d'ammoniaque qui est évaluée alcalimétriquement.

Les physiologistes emploient ordinairement pour le dosage de l'azote contenu dans la matière sèche d'un tissu végétal la méthode de KJELDAHL (fig. 2), basée sur le fait que l'acide sulfurique concentré bouillant

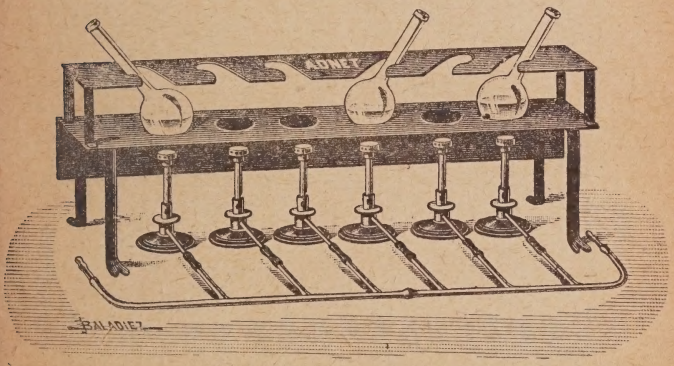


Fig. 2. — Dispositif employé pour l'analyse de l'azote total par la méthode de KJELDAHL.

détruit les matières azotées en transformant leur azote en sulfate d'ammoniaque ; il suffit donc de neutraliser, puis d'alcaliniser le liquide devenu limpide pour obtenir le déplacement de l'ammoniaque qui est distillée et recueillie dans une solution titrée d'acide sulfurique (fig. 3). Le plus souvent on ajoute à l'acide sulfurique, pour assurer et faciliter la transformation complète de l'azote en ammoniaque, différentes substances adjuvantes, telles que le mercure, le permanganate de potassium ou l'oxalate neutre de potassium.

La méthode de DUMAS libère tout l'azote des

matières organiques, quelle que soit la forme sous laquelle cet élément se trouve engagé ; il n'en est pas de même des méthodes de Will et Warrentrapp et de Kjeldahl qui ne peuvent être employées telles quelles lorsque la matière contient des nitrates ; il faut alors éliminer au préalable ces derniers en traitant à chaud par le chlorure ferreux et l'acide chlorhydrique, ou bien apporter des modifications aux méthodes en question ; on peut, par exemple, lorsqu'il s'agit du procédé à la chaux sodée, ajouter un corps réducteur tel que l'acétate de sodium, ou un mélange d'oxalate de calcium et de soufre ; la méthode de Kjeldahl, qui ne libère pas non plus l'azote des nitrates, qui est d'une réalisation difficile pour un certain nombre de composés et même impossible pour d'autres (pyridine, pyrazol), a été l'objet de nombreuses modifications. Pour arriver à doser les fonctions oxygénées de l'azote (nitrates, nitrites, dérivés nitrés, nitrosés...), on a établi des méthodes comportant un processus de réduction pouvant pré-

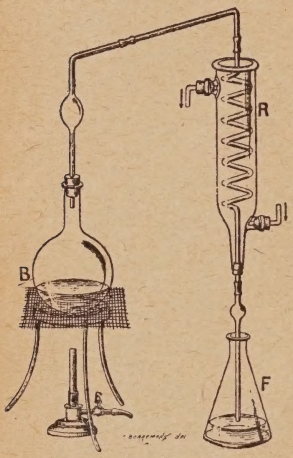


Fig. 3. — Appareil pour déterminer la quantité d'ammoniaque produite dans l'action de l'acide sulfurique sur les matières organiques azotées.

céder l'attaque par l'acide sulfurique ou se superposer à elle.

Parmi les procédés à deux temps, citons celui de JODLBAUER-MARTINETTI consistant à traiter tout d'abord la matière azotée par l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, le phénol et l'étain, puis par l'acide sulfurique et le bichromate de potassium ; dans le procédé de FOERSTER, à un seul temps, la substance est traitée par de l'acide sulfurique concentré additionné de 5 à 6 p. 100 de phénol, de l'hyposulfite de soude et un globule de mercure.

Si ces procédés ont l'avantage de rendre possible le dosage de l'azote nitrique, il faut avouer que certaines substances azotées résistent encore et que les nombres obtenus par voie humide ne sont que des nombres minima ; l'incertitude qui subsiste à l'égard de la méthode de KJELDAHL expliquera, nous le verrons, certaines contradictions relatives à d'importants problèmes de physiologie végétale.

Ces procédés analytiques nous renseignent sur le taux de l'azote dans les différents végétaux ou leurs organes ; on peut considérer que la composition centésimale moyenne de la matière sèche, déduction faite des cendres, est représentée comme il suit :

Carbone	50
Oxygène	40
Hydrogène	6
Azote	4

L'azote est donc beaucoup moins abondant que le carbone, ce qui ne diminue d'ailleurs en rien l'importance de son rôle physiologique ; la présence des substances dans la constitution desquelles entre l'azote

est aussi indispensable que celle des substances ternaires pour la production des manifestations vitales ; nous avons du reste déjà eu l'occasion de reconnaître que l'importance physiologique d'une substance est loin de se mesurer au taux pondéral sous lequel elle est représentée ; la vie résulte de l'interaction de toutes les substances existant dans la cellule, soit entre elles, soit avec celles qui constituent le milieu extérieur, et elle devient impossible quel que soit celui des éléments, dont nous avons pu antérieurement établir la liste, qui vient à faire défaut.

Le nombre des substances azotées que les méthodes d'analyse immédiate permettent d'isoler chez les végétaux est considérable, mais elles peuvent se ranger dans un petit nombre de groupes essentiels : substances protéiques et leurs dérivés, composés cyanogénétiques, alcaloïdes, graisses azotées ; nous nous adresserons tout d'abord au groupe fondamental des substances protéiques qui représentent les substances azotées les plus complexes, qui ne font jamais défaut dans une cellule, et c'est leur histoire qui nous retiendra le plus longuement.

CHAPITRE PREMIER

SUBSTANCES PROTÉIQUES ET LEURS DÉRIVÉS CHEZ LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

1. Propriétés générales des protéines

Les substances protéiques ou protéines existent toujours dans une cellule vivante ; on les trouve en dissolution dans la sève élaborée et dans le suc cellulaire, à l'état plus compact dans le cytoplasme ou le noyau, auxquels elles communiquent leur consistance spéciale, à l'état solide enfin, et constituant alors des réserves, dans les graines ; ce sont ces formes solides qui ont été le plus étudiées jusqu'ici, en raison de la plus grande facilité qu'on a de les isoler, bien qu'il soit toujours très difficile de les obtenir parfaitement exemptes de toute matière minérale ; nous n'envisagerons tout d'abord que les protéines des végétaux supérieurs (plantes vasculaires), réservant quelques renseignements ultérieurs en ce qui concerne les Thallophytes.

Lorsque les protéines se trouvent à l'état solide, elles sont amorphes ou cristallisées. La composition élémentaire des protéines les plus simples est assez

peu variable et peut être représentée par les nombres moyens suivants :

Carbone	53	100
Hydrogène	7	
Oxygène	22,5	
Azote	16,5	
Soufre	1	

Les nombres relatifs au carbone, à l'azote et à l'oxygène ne varient que de quelques unités et le soufre est toujours présent ; je transcris ci-dessous quelques exemples d'analyse élémentaire de protéines végétales, qui préciseront dans quelle mesure leur composition peut varier et comment elles se rapprochent à cet égard de l'albumine du blanc d'œuf :

	C	H	Az	O	S
Ovalbumine. .	53,21	7,21	14,99	23,41	1,18
Zéine	55,23	7,26	16,13	20,78	0,60
Tubérine . . .	53,62	6,80	16,15	22,21	1,22
Gluténine. . .	52,34	6,83	17,49	22,26	1,08
Amandine. . .	51,41	6,86	19,47	21,87	0,39
Conglutine b .	49,58	6,80	18,27	23,93	1,42

Les chaleurs de combustion sont assez voisines, mais les plus élevées se trouvent correspondre aux teneurs les plus considérables en carbone, comme l'indiquent les quelques nombres suivants :

	Chaleur de combustion	Teneur en carbone p. 100
Gluténine	5 704^{c}	52,3
Amandine	5 543	51,4
Conglutine b.	5 359	49,6

Les protéines donnent souvent à l'analyse un peu de cendres ; il semble bien qu'il ne s'agisse pas ordinai-

rement d'éléments entrant dans la constitution chimique de ces substances, mais bien d'ions adsorbés par elles.

On a cherché à établir le poids moléculaire des protéines par des mesures cryoscopiques ; mais les recherches ont uniquement porté sur des substances d'origine animale et ont d'ailleurs conduit à des nombres très variables pour une même protéine ; on a par exemple trouvé pour l'ovalbumine les nombres 5378 (Hofmeister), 14270 (Sabanajero et Alexandrow) et 32814 (Sutherland) ; ce dernier savant a été conduit pour la protéine en question à la forme moléculaire $C^{1436}\ H^{2364}\ Az^{359}\ O^{482}\ S^{15}$.

Ce qui est certain c'est que les molécules protéiques sont très grosses et ce fait est en rapport avec leur nature colloïdale.

2. Propriétés physiques

Toutes les protéines sont en effet des substances colloïdales ; on sait qu'on désigne sous le nom de cristalloïdes les matières qui, en présence de solvants appropriés, donnent de véritables solutions, où elles se résolvent en particules qui sont des molécules ou de l'ordre de grandeur des molécules ; il en résulte qu'elles ont la propriété de traverser les filtres très fins, tels que les membranes organiques : elles sont dialysables ; les colloïdes par contre ne donnent que des pseudo-solutions où elles se trouvent sous forme d'agrégats moléculaires relativement gros, ce qui ne leur permet pas de traverser les filtres assez fins et en particulier les membranes organiques ; elles sont

incapables de dialyser et cette propriété négative est utilisée pour les séparer des substances cristalloïdes ; comme toutes les pseudo-solutions de colloïdes celles des protéines sont opalescentes.

Des solutions suffisamment concentrées et chaudes de certaines protéines peuvent se prendre par refroidissement en gelées ; on arrive au même résultat en partant de ces substances à l'état sec et en les mettant en présence d'une quantité d'eau relativement faible ; ces gelées (gels) ne paraissent pas d'ailleurs avoir des propriétés sensiblement différentes de celles des solutions colloïdales (sols) ; on peut par exemple précipiter les protéines à l'état de gels, comme nous allons voir que la chose est réalisée pour les sols ; c'est à cet état de gels que les protéines paraissent principalement exister dans les cellules et la chose est surtout importante à signaler à cause de la propriété que possèdent les gels de pouvoir fixer de grandes quantités d'eau ; cet état n'est d'ailleurs pas spécial aux protéines et il se trouve réalisé pour beaucoup de substances ternaires colloïdales telles que l'amidon, les mucilages, les gommes.

Pouvoir rotatoire. — Les protéines sont toutes lévogyres ; leur pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ est souvent voisin de — 45° ; mais il est variable entre — 28° (zéine) et — 92° (gliadine) ; sa valeur dépend d'ailleurs pour une même protéine de la nature du solvant.

Solubilité. — Avec la restriction qu'implique leur nature colloïdale les protéines sont solubles, les unes dans l'eau pure, les autres dans certaines solutions

salines ; un petit nombre sont solubles dans l'alcool et ces propriétés différentielles sont utilisées : 1° pour l'extraction des diverses substances protéiques ; 2° en vue de leur classification provisoire.

On a pu dans certains cas obtenir, à partir de leurs solutions, les substances protéiques à l'état cristallisé ; l'intérêt que peut présenter *à priori* l'obtention des protéines cristallisées réside dans la pureté plus grande qu'elles doivent présenter par rapport à l'état amorphe ; mais on a pu objecter (Gurber) que ces cristaux constituent peut-être des combinaisons entre les substances protéiques et l'acide du sel contenu dans la solution.

Précipitation. — Les protéines sont précipitées de leurs pseudo-solutions par de nombreux réactifs dont les principaux sont les suivants :

Les *acides minéraux* tels que l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide métaphosphorique PO^3H (ni l'acide orthophosphorique PO^4H^3 ni l'acide pyrophosphorique $P^2O^7H^4$ n'ont d'action). On peut réaliser l'expérience avec l'acide nitrique en versant celui-ci dans le fond du vase où se trouve la solution de protéine ; il se forme un nuage à la surface de séparation des deux liquides ; le précipité ainsi produit est soluble dans un excès d'acide.

Les *sels des métaux lourds*, tels que le sulfate de cuivre, l'acétate de plomb, l'acétate de fer, le bichlorure de mercure, donnent avec les solutions de protéines des précipités qui correspondent à des composés organométalliques.

Le *ferrocyanure de potassium* en solution étendue et

en présence d'acide acétique précipite aussi les protéines.

Le *sulfate d'ammonium* en solution saturée à 15° ou le sulfate de sodium saturé à 30° précipite totalement les protéines.

En ce qui concerne les sels alcalins le pouvoir de précipitation des protéines dépend à la fois de leur anion et de leur cation ; les cations se rangent d'après leur pouvoir croissant de précipitation dans l'ordre suivant : Na, K, AzH^4 ; les anions dans l'ordre : I, Br, AzO^3, Cl, radicaux des acides acétique, tartrique et citrique, PO^4, SO^4, Fl.

On utilise souvent encore, pour la précipitation des protéines, le chlorure de sodium, le chlorure de magnésium et le sulfate de zinc.

L'*alcool* produit également une précipitation, surtout en liqueurs neutres ou acides; l'acétone agit de même.

Les protéines sont encore précipitées par le *tannin* ; le réactif d'Almen a la composition suivante :

Tannin	4 gr.
Alcool 95°.	190 cm^3
Acide acétique.	2 cm^3

Citons encore, parmi les substances capables de déterminer la précipitation des protéines dissoutes, les solutions sulfuriques d'acide phosphomolybdique ou d'acide phosphotungstique ; la liqueur de Brucke (iodure de potassium et de mercure) qui agit sur les solutions acides, ou la liqueur de Tanret qui à la même composition que la précédente, mais qui est rendue acide ; l'iodure de potassium et de bismuth ; l'acide picrique en solution aqueuse concentrée ;

l'acide trichloracétique (solution de 2,5 à 10 p. 100) ; l'acétate d'urane, l'acide nucléique, etc. .

Les substances ainsi précipitées, isolées, puis reprises par le solvant initial se dissolvent à nouveau et restent absolument semblables à ce qu'elles étaient ; toutes leurs propriétés subsistent ; il n'y a eu qu'un simple changement d'état physique.

3. Propriétés chimiques

Coagulation. — Certaines protéines, chauffées vers 100° ou à une température inférieure à 100° (suivant les espèces), donnent naissance à un dépôt floconneux ; elles ne peuvent plus alors se dissoudre à nouveau ; il s'est à la fois produit un changement d'état physique et une modification chimique consistant dans la coagulation.

Nous avons dit que l'alcool précipite les protéines ; si le précipité est repris aussitôt après il se redissout ; mais si le contact avec l'alcool dure plusieurs jours les flocons ne se redissolvent plus ; il y a donc eu d'abord précipitation, puis coagulation.

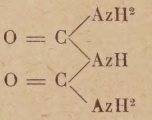
Pour que la coagulation par la chaleur soit totale, même à 100°, il est nécessaire que le liquide soit acidulé de 1 à 2 p. 100 d'acide acétique.

Si par la dialyse on débarrasse les solutions de protéines de toute trace de sels minéraux, elles perdent la propriété de se coaguler et elles la recouvrent par l'addition de traces d'un sel minéral.

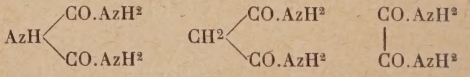
Réactions colorées. — Les protéines présentent un certain nombre de réactions colorées, dont aucune

prise isolément n'est caractéristique de ces substances ; mais leur ensemble permet d'établir la nature protéique des matières qui les présentent simultanément. On peut par exemple réaliser ces réactions avec les protéines contenues dans les graines de Pois ; il suffit de moudre ces graines, de les laisser digérer une heure dans l'eau et de filtrer.

a. *Réaction du biuret.* — Si à une solution de protéine on ajoute de la soude en excès, puis quelques gouttes d'une solution de sulfate de cuivre, on obtient une coloration variant du bleu violet au violet ; cette réaction très sensible (elle permet de déceler $\frac{1}{10.000}$ de protéine) est due à la formation du biuret dont la formule peut s'écrire



et qui résulte de la soudure de deux restes d'urée. Schiff rapporte cette réaction à l'existence dans la molécule des protéines de divers groupements tels que les amides.



b. *Réaction xanthoprotéique.* — Par l'action de l'acide azotique à froid ou mieux à l'ébullition, les protéines donnent une coloration jaune serin, devenant orangé foncé si on rend le liquide alcalin à l'aide de potasse, de soude et particulièrement d'ammoniaque.

Cette réaction est due à la formation de dérivés nitrés jaunes provenant de groupements aromatiques.

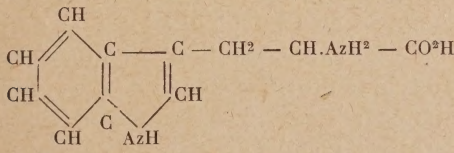
c. *Réaction de Millon.* — L'azotate acide de mercure (azotate de mercure en solution dans de l'acide nitrique contenant des composés nitreux) donne avec les solutions de protéines un précipité blanc ; puis, lentement à froid, rapidement à l'ébullition, le précipité prend une coloration rouge brique ; la réaction permet de déceler $\frac{1}{2.500}$ de protéine.

Elle est due au groupement tyrosine (acide paraoxyphénylaminopropionique)

$$C^6H^4.OH - CH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$$

elle se produit en présence de ce corps fourni isolément et plus généralement avec tous les dérivés monohydroxylés du benzol.

d. *Réactions dues à la présence du groupe tryptophane.* — Ce corps qui engendre l'indol et le scatol a pour formule



et n'est autre chose que l'acide indol-aminopropionique, acide aminé hétérocyclique ; il présente et communique aux protéines dans la constitution desquelles il entre les réactions suivantes.

d_1. *Réaction d'Adamkiewicz.* — On obtient une coloration violette en ajoutant aux solutions de protéines un mélange de 1 volume d'acide sulfurique et 2 volumes d'acide acétique glacial ; le liquide présente une large bande d'absorption entre les raies C et F.

On a reconnu depuis que l'acide acétique n'intervenait que par les traces d'acide glyoxylique (COH — CO^2H) qu'il contient ; on obtient actuellement la réaction en effectuant le mélange suivant :

1 vol. acide sulfurique concentré
1 vol. acide glyoxylique dilué
1 vol. solution de protéine.

La réaction ne se produit pas en présence d'une quantité assez considérable de chlorures, non plus qu'en présence des nitrates ou des nitrites.

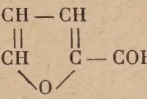
d_2. *Réaction de Liebermann.* — Si on fait bouillir une solution de protéine avec de l'alcool, puis de l'éther, puis enfin de l'acide chlorhydrique on obtient encore une coloration bleue, due à ce que l'éther contient, lui aussi, comme impureté de l'acide glyoxylique.

d_3. *Réaction de Reichl.* — On obtient encore une coloration bleue en traitant une solution de protéine par un mélange d'une solution alcoolique de benzaldéhyde, d'acide sulfurique étendu de son volume d'eau et de sulfate ferrique.

Ces dernières réactions ne se produisent pas avec certaines matières protéiques d'origine animale, telles que la gélatine, que nous n'aurons d'ailleurs pas à considérer ici.

f. *Réaction furfurique.* — Les substances protéiques

traitées à chaud en présence de sucre par l'acide chlorhydrique concentré donnent naissance à une coloration violette virant peu à peu au brun (réaction de RASPAIL) ; elle est due à la formation de furfurol



aux dépens du sucre et de noyaux phénoliques de la protéine ; plusieurs substances protéiques donnent d'ailleurs la réaction en question sans qu'il soit besoin de leur adjoindre du sucre ; ce sont celles qui contiennent dans leur molécule un groupement hydrocarboné. Nous retrouvons ici la réaction de MOLISCH que nous avons vu caractériser les sucres ; elle consiste à faire agir sur ceux-ci de l'acide sulfurique concentré en présence d'une substance phénolique telle que l'α-naphtol.

g. Réactions liées à l'existence du soufre. — Une solution de protéine chauffée en présence de soude et d'acétate de plomb donne une coloration noire due à la production de sulfure de plomb aux dépens du sulfure de sodium formé.

Détermination quantitative des protéines. — Les propriétés présentées par les protéines de se précipiter ou de se coaguler permettent de les séparer des autres substances azotées qui ne présentent pas ces propriétés ; c'est ainsi que STUTZER a utilisé la formation d'une combinaison insoluble dans l'eau des protéines avec l'hydrate d'oxyde de cuivre ; le précipité ainsi

obtenu à partir d'une décoction d'organe est lavé à l'eau puis à l'alcool et desséché ; il se trouve contenir toutes les protéines ; traité par la méthode Kjeldahl, il renseigne sur le taux de l'organe en azote engagé dans les substances protéiques, en azote protéique comme on dit plus rapidement, et permet la comparaison avec le taux de l'azote restant, c'est-à-dire de l'azote non protéique ou azote soluble ; on obtient ainsi, pour 100 d'azote total, des quantités très variables d'azote protéique, par exemple 58,7 dans des tubercules de Pomme de terre, 73,1 dans de jeunes tiges feuillées de Luzerne.

4. Classification des protéines végétales

Une classification rationnelle des protéines, basée sur des données chimiques, est pour l'instant impossible ; la classification adoptée par le Comité américain, et qui n'a d'ailleurs qu'un caractère provisoire, est basée sur les propriétés de solubilité ; les grandes divisions actuellement adoptées sont les suivantes :

Protéines simples { naturelles / dérivées
Protéines conjuguées (protéides).

ces dernières étant constituées par des combinaisons des protéines naturelles avec d'autres substances.

A. Protéines simples naturelles

Correspondant surtout à des substances de réserve, ces protéines ont les propriétés générales qui viennent d'être indiquées précédemment ; elles sont en

particulier coagulables par la chaleur ; en ne tenant compte que des groupes actuellement représentés en botanique, elles comprennent les albumines, les globulines, les glutélines et les prolamines.

a. Albumines

Ces protéines sont *solubles dans l'eau pure*, solubles dans les solutions étendues (1 p. 100) des sels neutres des métaux alcalins et alcalino-terreux (par exemple de chlorure de sodium, de sulfate de sodium, de sulfate de magnésium) ainsi que dans les solutions d'alcalis caustiques (1 p. 1000).

Ces solutions ne sont précipitées ni par dialyse ni par dilution, non plus que par l'addition d'acide acétique ; le chlorure de sodium, le sulfate de sodium, le sulfate de magnésium en solution saturée à 15° ne déterminent pas de précipitation si les liquides sont neutres ; mais il y a avec ces substances précipitation si les solutions sont acidifiées, par exemple à l'aide d'acide acétique ; enfin le sulfate d'ammonium saturé détermine une précipitation, même en solution neutre.

Cette catégorie, qui comprend l'ovalbumine, la sérumalbumine, la lactalbumine animales, est représentée chez les végétaux par :

La *leucosine* isolée des grains de céréales (Blé, Seigle, Orge) ; il suffit pour l'obtenir de traiter de la farine de Blé par l'eau pendant quelques heures et de filtrer ; par la chaleur on obtient la coagulation de l'albumine en question ;

La *légumélline* provenant des graines de différentes Légumineuses (Pois, Vesce, Fève, Lentille...) ;

La *phaséline* des grains de Haricot ;

La *ricinine* des graines de Ricin.

On rencontre des albumines ainsi que des globulines dans la sève libérienne des arbres.

b. Globulines

Ce sont des protéines *insolubles dans l'eau pure* ; comme les albumines elles sont solubles dans des solutions étendues (1 p. 100) des sels neutres des métaux alcalins ou alcalino-terreux, ainsi que dans des solutions étendues (1 p. 1000) d'alcalis. Mais, à l'inverse des albumines, leurs solutions sont précipitées soit par dialyse, soit par dilution. Elles sont précipitées partiellement par l'acide acétique, partiellement ou totalement par le chlorure de sodium saturé, totalement par le sulfate de magnésium saturé et, comme les albumines, par le sulfate d'ammonium saturé.

Plusieurs de ces globulines végétales ont été obtenues à l'état cristallisé ; prenons par exemple des graines de Chanvre, broyons-les et traitons-les par du chlorure de sodium à 5 p. 100 vers 50° ; filtrons à chaud ; par refroidissement il se forme dans le filtrat des cristaux d'une globuline, l'édestine. Mais c'est surtout par dialyse des solutions qu'on obtient des sphéroïdes ou des cristaux qui sont le plus souvent constitués par un sel de la globuline correspondante ; ces productions artificielles sont d'ailleurs semblables à celles que nous observerons dans les cellules ; les

grains d'aleurone et particulièrement le ou les cristalloïdes qu'ils présentent, sont constitués par des globulines qui forment le groupe le plus nombreux des protéines qu'on rencontre chez les graines. On peut suivre sous le microscope la formation de cristaux d'édestine à l'intérieur d'une solution introduite dans un dialyseur et on réalise des cristallisations analogues avec les globulines de la graine de Lin, du *Bertholletia excelsa*, de la Noix de Coco, de l'*Helianthus annuus*, du Cotonnier et de la Moutarde.

La composition élémentaire des globulines paraît un peu différente de celle des albumines ; elles contiennent un peu moins de carbone (51,5 au lieu de 53 p. 100) et un peu plus d'azote (18 au lieu de 16,5 p. 100). Alors que chez les animaux les globulines sont représentées par le fibrinogène, la myosine, l'ovovitelline, la sérumglobuline et la lactoglobuline, on connaît comme globulines végétales les types suivants, tous extraits des réserves accumulées dans les graines :

La *légumine* (Pois, Fève, Lentille) ;
La *glycinine* (Glycine hispida = Soja) ;
La *phaséoline* (Haricot) ;
La *conglutine* (Lupins) ;
La *viciline* (Pois, Fève) ;
La *coryline* (Noisette) ;
L'*amandine* (graines du Prunier, de l'Amandier) ;
La *juglandine* (Noix) ;
L'*édestine* (graines de Chanvre) ;
La *castanine* (Châtaigne) ;
La *tubérine* (tubercules de Pomme de terre) ;
La *maïsine* (Maïs).

Réaction amphotère des protéines. — Les différentes protéines simples se comportent à la fois comme des acides et comme des bases du fait d'un groupe aminé libre ; le fait a été surtout bien étudié pour l'édestine et c'est la raison qui nous amène à signaler à cette place cette propriété générale des protéines.

En tant que globuline, l'édestine est, à l'état pur, insoluble dans l'eau ; si on ajoute un peu d'acide chlorhydrique, alors qu'il n'existe pas trace de sels minéraux dans la solution, il se produit une dissolution de la substance qui peut être ensuite précipitée par l'addition d'un peu de sel neutre (de chlorure de sodium par exemple) ; on obtient ainsi un sel, un chlorure d'édestine. Si on lave le précipité à l'alcool, celui-ci enlève le chlorure de sodium et le précipité se redissout dans l'eau ; on constate l'acidité de la solution et on peut l'évaluer à l'aide d'une solution titrée de potasse en présence d'un indicateur tel que la phénophtaléine ; quand on arrive à la neutralisation, l'édestine se précipite à nouveau.

Quant à la propriété acide de l'édestine, elle correspond à sa combinaison avec les métaux lourds ; on constate d'ailleurs que la substance a même équivalent vis-à-vis des bases et des acides.

c. Glutélines

Les glutélines sont des protéines simples naturelles insolubles dans l'eau pure, insolubles dans les solutions salines neutres dont il a été question précédemment, insolubles dans l'alcool, mais solubles dans les acides étendus ou les alcalis.

La mieux connue est la *gluténine* extraite de la farine de Blé.

d. Prolamines

Les prolamines se distinguent des trois catégories précédentes par leur solubilité dans l'alcool ayant un titre de 70° à 90° ; elles sont insolubles dans l'alcool absolu. Elles sont d'ailleurs insolubles ou très peu solubles dans l'eau ; leurs sels se dissolvent facilement dans les acides ou les alcalis. Ce sont la *gliadine* extraite de la farine de Blé, l'*hordéine*, la *zéine*, dont les noms indiquent suffisamment l'origine.

Séparation des différentes sortes de protéines simples. — On voit que les différentes catégories de protéines simples qui viennent d'être caractérisées sont représentées en particulier dans la farine des Céréales telles que le Blé ; par des opérations très simples, dérivant de ce qui vient d'être dit, on peut réaliser la séparation des protéines qu'elles contiennent. Faisons digérer de la farine de Blé dans de l'eau pendant quelques heures ; filtrons d'abord sur de la mousseline, puis sur un filtre à vide ; le liquide filtré chauffé donne par coagulation de la leucosine. Le premier résidu traité pendant une journée par du chlorure de sodium à 10 p. 100 et filtré donne naissance, par l'ébullition en présence d'un peu d'acide, à une globuline coagulée. Le second résidu additionné d'alcool à 90° à chaud, puis filtré, abandonne de la gliadine. Enfin le troisième résidu est traité par de la potasse à 1 p. 1000 ; le filtrat est additionné d'acide sulfurique déci-normal goutte à goutte ; il se produit un précipité de gluténine.

C'est la gliadine qui forme avec l'eau la masse pâteuse et élastique constituant le gluten ; on démontre aisément cette intervention de la gliadine en traitant à plusieurs reprises de la farine par de l'alcool à 70° pendant trois jours et en la desséchant ensuite. On enferme ensuite dans deux mousselines une pâte formée de farine normale et une pâte faite avec de la farine débarrassée de sa gliadine par l'alcool ; si on vient à malaxer ces deux pâtes sous un courant d'eau, on constate que dans le premier cas il reste dans la mousseline une masse élastique de gluten alors que tout passe dans le cas de la farine privée de sa gliadine.

Si on analyse séparément les protéines contenues dans l'albumen et celles qui proviennent de l'embryon du Blé, on obtient des résultats assez différents ; pour 100 de substance sèche on obtient les quantités suivantes des diverses protéines :

	Albumen	Embryon
Albumines	0,39	10
Globulines	0,62	5
Gluténines	4,68	0
Gliadines	3,96	0
Protéoses	0,21	3
Total	9,86	18

En résumé les protéines simples naturelles qu'on rencontre chez les végétaux peuvent être groupées de la manière qui suit :

Solubles dans l'eau			*Albumines.*
Insolubles dans l'eau	Insolubles dans l'alcool	Solubles dans les solutions salines neutres.	*Globulines.*
		Insolubles	*Gluténines.*
	Solubles dans l'alcool		*Prolamines*

Localisation, caractères histologiques des protéines. — Les propriétés générales que nous avons reconnues aux protéines et les réactions que nous avons indiquées pour les caractériser peuvent être utilisées pour en déceler la présence dans les cellules végétales, surtout lorsqu'elles y existent en quantité assez considérable; il s'agit de renseignements donnés par des méthodes d'ordre histologique et qui sont capables de nous renseigner sur la localisation des substances étudiées.

La réaction du biuret se réalise en imprégnant des coupes de graines (Pois ou Haricot par exemple) d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre, les lavant et les portant dans de la lessive de potasse étendue de son volume d'eau.

Pour obtenir la réaction xanthoprotéique, on introduit de telles coupes dans de l'acide nitrique concentré et chaud; il apparaît une coloration jaune foncé; si on ajoute de la lessive de soude elles deviennent d'un brun rouge et prennent une coloration orange dans une solution d'ammoniaque.

On emploie fréquemment, pour déceler les protéines dans les tissus, la réaction de Millon; des coupes traitées à froid ou mieux à une chaleur faible donnent, au bout d'un certain temps, une coloration rouge en présence des substances protéiques; c'est par exemple le cas pour l'assise périphérique de l'albumen des céréales, celle qu'on a précisément appelée l'assise protéique. Mais il y a lieu de rappeler que cette réaction n'est pas caractéristique et qu'elle peut résulter de la présence d'autres corps, tels que la tyrosine, l'acide salicylique, le phénol, le thymol, la vanilline...

et d'une manière générale des corps qui présentent un noyau aromatique monohydroxylé ; comme lors de l'emploi macroscopique de la réaction, il est nécessaire de la combiner avec les autres.

La réaction tryptophanique a été plus spécialement adaptée à l'examen histologique ; elle correspond à l'emploi des aldéhydes tels que l'aldéhyde salicylique, l'aldéhyde anisique, la vanilline.

Les coupes sont abandonnées vingt-quatre heures dans une solution d'aldéhyde à 1 p. 100, puis portées sur une lame dans une goutte d'acide sulfurique étendu de son volume d'eau et contenant quelques gouttes d'une solution de sulfate ferrique ; une coloration apparaît de suite ou au bout d'une heure environ ; avec l'aldéhyde salicylique elle varie du bleu au violet, avec l'aldéhyde anisique du rouge violet au bleu violet, avec la vanilline du violet au lilas ; ces colorations peuvent encore s'observer à un fort grossissement (800 diam.). On a obtenu de bons résultats avec des coupes longitudinales de tiges et de racines de plantules âgées d'une dizaine de jours (Maïs, Haricot, Courge, Sapin).

La réaction furfurique a pu également être utilisée d'une manière histologique ; elle n'est pas absolument spécifique et peut se produire avec certains glucosides et alcaloïdes ; elle se produit souvent sans addition de sucre, par la seule action de l'acide sulfurique concentré, ce qui tient, ou bien à la présence de sucre dans les protéines, ou à sa formation aux dépens de polysaccharides qui se trouvent hydrolysés (amidon, cellulose).

On a aussi préconisé (Zacharias) pour la localisation des protéines une réaction consistant en la formation de bleu de Prusse. On laisse les coupes pendant une heure dans un mélange à volumes égaux d'eau, d'acide acétique et d'une solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10 p. 100, puis on porte dans de l'alcool à 60°, et on lave longuement ; on ajoute ensuite du perchlorure de fer étendu qui forme du bleu de Prusse à partir du ferrocyanure de potassium qui s'est combiné aux protéines ; l'emplacement de celles-ci est donc exactement marqué par la vive coloration du bleu de Prusse.

Enfin, nous allons constater que les protéines sont capables de fixer certaines substances colorantes dérivées de l'aniline (fuchsine, acide, éosine...), mais cette absorption n'a aucun caractère électif ; elle est simplement commode à utiliser pour l'étude morphologique de substances dont on connaît par ailleurs la nature protéique.

Protéines présentant un état figuré. — *Grains d'aleurone.* — Ces différentes réactions sont surtout utiles pour faire l'étude histologique des matières protéiques de réserve qui se trouvent en abondance dans les graines, et particulièrement dans celles qui sont riches en huile ; la dessiccation des cellules qui s'effectue lors de la maturation des graines détermine la précipitation à l'état solide des matières protéiques tout d'abord dissoutes dans le liquide des vacuoles ; il se constitue alors des corps figurés, désignés sous le nom de grains d'aleurone, dont les dimensions peuvent varier de 1 à 55 μ et dont la constitution dépend

de la nature spécifique du végétal ; envisageons quelques exemples de complexité croissante.

Adressons-nous tout d'abord à la graine de Pois ; si nous faisons une coupe dans un cotylédon de cette graine, que nous la traitions tout d'abord par une

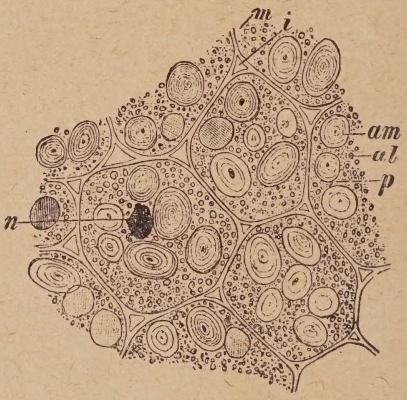


Fig. 4. — Cellules cotylédonaires du Pois occupées par des grains d'amidon *am* et de nombreux petits grains d'aleurone *al*.

solution iodo-iodurée, puis par une solution de fuchsine, nous observons au microscope, après lavage de la coupe, que chaque cellule contient de gros grains ovoïdes, à couches concentriques, qui se sont colorés en bleu et qu'il est facile de reconnaître comme étant des grains d'amidon, et une masse fondamentale presque uniquement constituée par de petits grains arrondis, ayant fixé la fuchsine et pouvant présenter un petit nombre de couches concentriques (fig. 4). Traités par une solution de potasse ou de phosphate

de potasse, les grains d'aleurone se dissolvent entièrement. L'assise protéique de l'albumen des Graminées contient uniquement comme inclusions de ces grains homogènes (fig. 5).

Passons au cotylédon du Lupin ; on observe dans une coupe pratiquée dans cet organe une série de

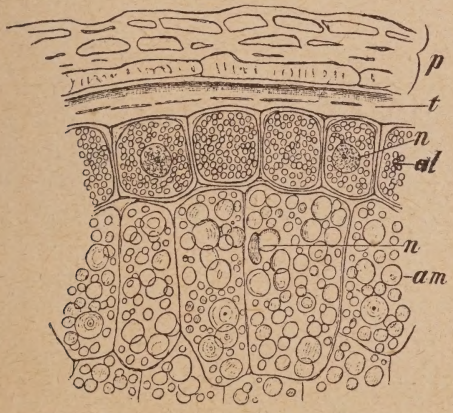


Fig. 5.

Coupe transversale de la zone périphérique d'un grain de Blé. En dehors du tissu amylifère *am*, on observe en *al* une assise protéique dont les cellules sont remplies de grains d'aleurone.

masses polyédriques correspondant chacune à un grain d'aleurone du Pois (fig. 6) ; mais à l'intérieur de chacune d'elles existent de nombreuses inclusions ; il s'agit de corps figurés amorphes qui ont reçu le nom de *globoïdes* ; ils se sont constitués avant la solidification de la substance protéique fondamentale de la vacuole et ont été englobés finalement par elle. Ces corps sont insolubles dans l'eau, l'alcool, la potasse

étendue, solubles au contraire dans les acides minéraux étendus ; si on fait agir une solution de phosphate d'ammonium on les voit disparaître, mais à leur place il se forme des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien, ce qui met en évidence l'existence de magnésium ; une solution d'oxalate d'ammonium détermine de même la formation d'oxalate de calcium, ce qui montre que le calcium est un des constituants des globoïdes ; on obtient de même, après incinération, du phosphate ammoniaco-magnésien par l'addition d'une solution ammoniacale de chlorure d'ammonium ; il existe donc du phosphore ; mais cette réaction n'a lieu qu'après incinération, ce qui donne à penser que le phosphore est engagé dans une combinaison organique ; on regarde généralement ces globoïdes comme formés par un glycérophosphate de magnésium et de calcium, avec prédominance du magnésium.

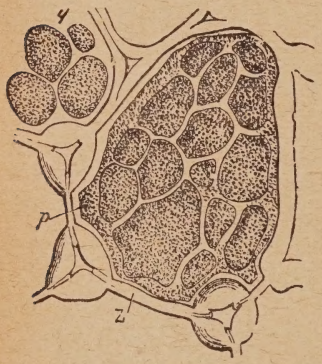


Fig. 6. — Cellules cotylédonaires du Lupin, à l'intérieur desquelles on aperçoit plusieurs grains polyédriques d'aleurone, contenant chacun de nombreux petits globoïdes.

Dans d'autres cas, on observe comme enclaves à l'intérieur des graines d'aleurone, non plus des formations amorphes, mais des corps apparaissant à l'état cristallisé ; c'est ainsi que dans la graine de Coriandre

les grains d'aleurone contiennent vers leur partie centrale une mâcle en oursin d'oxalate de calcium (fig. 7, 3).

Mais le plus souvent, les corps cristallisés qu'on rencontre dans les grains d'aleurone sont de nature protéique; on les désigne sous le nom de *cristalloïdes*; le cas est fréquent chez les Ombellifères et certaines Composées (Scorzonère); tantôt il n'y a qu'une de ces formations par grain d'aleurone, tantôt on en observe plusieurs. Il est assez facile, pour les étudier, de les extraire du tissu qui les renferme; il suffit de pulvériser la graine et de traiter par de l'éther; les cristalloïdes se déposent par repos au fond du liquide, formant une sorte de farine. On en a distingué deux types correspondant à des familles différentes; les uns appartiennent au système cubique, les autres présentent une double réfraction; ceux du *Bertholletia* ont été identifiés avec la vitelline. Dissous dans l'eau à 50° ils peuvent, par évaporation lente, donner à nouveau des cristalloïdes; on en obtient également, et de relativement gros, avec les combinaisons qu'ils forment en présence d'eau de chaux, de baryte ou de magnésie.

Ces différentes enclaves, globoïdes, oxalate de calcium, cristalloïdes protéiques, ne sont d'ailleurs pas incompatibles.

Certains grains d'aleurone contiennent à la fois des cristaux d'oxalate de calcium et des cristalloïdes c'est le cas pour la graine d'*Æthusa Cynapium* (fig. 7, 2); dans cette même plante on observe aussi des cellules dont les grains d'aleurone ont à la fois un globoïde et un cristalloïde; mais c'est, parmi les

graines qui présentent une telle combinaison, celle du Ricin qui a été le mieux étudiée et qui constitue l'un des matériels le plus favorables.

Faisons une coupe dans l'albumen de cette graine et observons-la dans de l'huile ou de la glycérine,

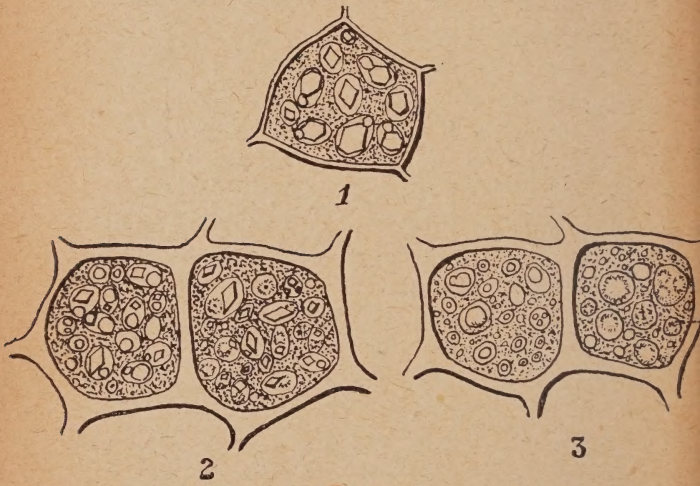


Fig. 7. — Grains d'aleurone. 1, Graine du Ricin; 2, graine de l'*Œthusa Cynapium*; la cellule de gauche présente des grains d'aleurone pourvus d'un cristalloïde et d'un globoïde; celle de droite d'un cristalloïde et d'un cristal d'oxalate de calcium; 3, graine de Coriandre; dans la cellule de gauche les grains d'aleurone sont pourvus d'un globoïde, dans celle de droite d'un cristal d'oxalate de calcium.

substances dans lesquelles l'huile de Ricin est soluble; si on veut pratiquer l'observation dans l'eau, il suffit de se débarrasser au préalable de l'huile par l'alcool ou l'éther. Dans chaque cellule (fig 7,1) se trouvent

de nombreux grains ovoïdes, constitués par une masse fondamentale protéique, soluble dans la potasse, l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique ; chacun de ces grains contient à son tour un ou plusieurs globoïdes et un gros cristalloïde.

Les globoïdes ne se colorent pas, contrairement à ce qui se passe pour les cristalloïdes, par la solution

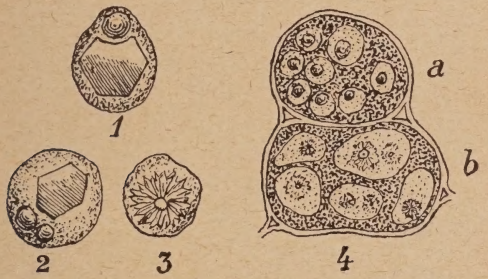


Fig. 8.— Grains d'aleurone : 1, du Lin ; 2, du Ricin ; 3, de *Phellandrium* avec cristal d'oxalate de calcium ; 4, de *Carum Carvi ;* en *a* les grains d'aleurone contiennent des globoïdes, en *b* des cristaux d'oxalate de calcium.

iodo-iodurée ; lorsqu'on dissout la masse fondamentale par la potasse, ils subsistent et apparaissent avec une grande netteté.

Le cristalloïde n'est pas très apparent à un simple examen dans l'huile ou l'eau, parce que sa réfringence est de même ordre que celle de la masse fondamentale et que son contour se confond presque avec celui du grain lui-même ; on le rend très visible en traitant les coupes par une solution concentrée de phosphate de sodium qui ne laisse subsister que le cristalloïde. On peut d'ailleurs différencier le cristal-

loïde et les globoïdes par des méthodes de coloration ; c'est ainsi qu'après fixation par l'acide picrique et coloration par l'éosine, le cristalloïde apparaît coloré en jaune et avec des contours très nets ; de même avec la nigrosine la masse fondamentale acquiert une coloration bleue, les globoïdes restent incolores et le cristalloïde devient d'un vert jaunâtre.

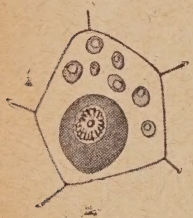


Fig. 9.— Cellule de l'albumen de Vigne avec un gros grain d'aleurone contenant un globoïde, à l'intérieur duquel s'est constitué un cristal d'oxalate de calcium.

La masse fondamentale, ainsi que les cristalloïdes, paraît, d'après ses propriétés de dissolution, être constituée par une globuline (édestine).

Il est rare de trouver dans les grains d'aleurone du Ricin, en outre des enclaves que nous venons de considérer, des cristaux d'oxalate de calcium, mais cette complication maxima se trouve réalisée normalement dans la graine de la Vigne (fig. 9) ; l'un des grains d'aleurone d'une cellule apparaît comme beaucoup plus volumineux que les autres et il présente un globoïde à l'intérieur duquel se trouve une mâcle en oursin d'oxalate de calcium.

Cristalloïdes protéiques présentés par des cellules ordinaires. — Nous avons rapporté à un phénomène de dessiccation des cellules de réserve des graines l'existence de corps figurés de nature protéique ; en fait nous ne trouvons de grains d'aleurone que dans

les graines ; mais des inclusions protéiques cristallisées peuvent se rencontrer dans des cellules qui n'ont pas subi la dessiccation en question. Il n'est pas rare d'en rencontrer en particulier dans le cytoplasme ou même dans le suc cellulaire ; c'est ainsi que dans les tubercules de Pomme de terre on en observe d'une manière constante dans le parenchyme qui se trouve en dessous du liège (fig. 10) ; il s'agit de gros cristalloïdes cubiques ; on en a signalé de même dans les cellules épidermiques d'*Epiphyllum* où ils offrent souvent un aspect fibrillaire ; il en existe encore dans différents latex (*Musa, Amorphophallus, Rivieri*...) où ils apparaissent comme se constituant dans des vacuoles.

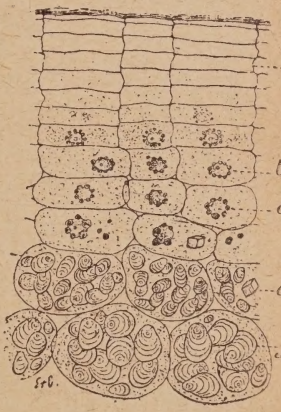


Fig. 10. — Coupe transversale de la zone périphérique du tubercule de Pomme de terre ; on observe, dans l'assise amylifère externe et dans l'assise voisine, des cristalloïdes protéiques cubiques.

D'autres fois on observe des cristalloïdes protéiques dans des leucites (chloroleucites, chromoleucites ou amyloleucites) (fig. 11) sous forme de tablettes ou d'aiguilles ; la figure 11 représente de ces formations dans les chloroleucites de *Cerinthe* et de *Phajus ;* il ne faut naturellement pas les confondre avec les cristaux de carotine qu'on peut rencontrer dans ces mêmes leucites.

Le noyau cellulaire peut lui-même présenter à son intérieur des cristalloïdes protéiques (fig. 12); il existe à cet égard toutes les transitions entre

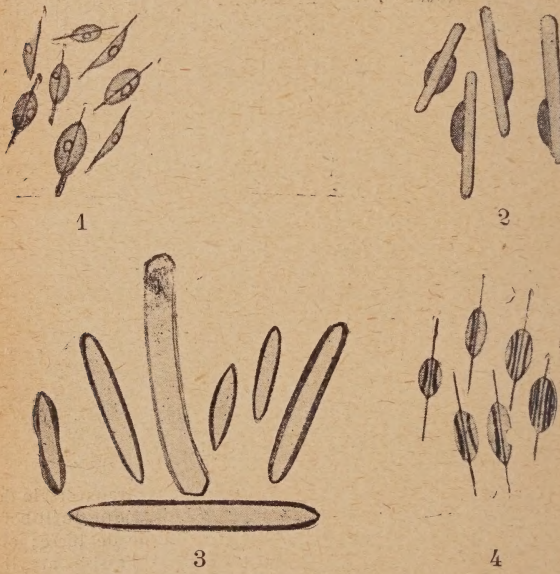


Fig. 11. — Leucites présentant des cristaux protéiques.
1, parenchyme foliaire de *Canna:* 2, écorce de la racine de *Phajus grandiflora;* 3, épiderme de la tige de *Cerinthe glabra;* 4, tige de *Neottia Nidus avis.*

des cristaux parfaitement définis et des corps figurés sphériques; ils fixent facilement la fuchsine acide.

Dans certains cas on observe des productions tout à fait identiques aux précédentes, mais accolées

contre le noyau et pouvant l'entourer entièrement,

Fig. 12. — Cristalloïdes protéiques dans le noyau.
1, cellules du parenchyme lacuneux de *Melampyrum arvense* ; 2, paroi du fruit de *Russelia juncea;* 3, épiderme de *Polypodium cæspitosum;* 4, épiderme du péricarpe de *Campanula Trachelium.*

comme cela arrive dans certaines cellules de *Genista ætnensis.*

B. Protéines simples dérivées

Leurs réactions sont celles des protéines précédentes, dont elles proviennent par coagulation ou par digestion.

Les **protéines coagulées** dérivent des catégories envisagées plus haut ; elles sont insolubles dans l'eau, dans les solutions salines neutres et dans les alcalis dilués.

Les **protéoses** proviennent de l'action, sur les protéines naturelles ou coagulées, du suc gastrique, du suc pancréatique ou des diastases végétales correspondantes, ou bien de l'action de la vapeur d'eau sur-

chauffée, ou encore des alcalis ou des acides étendus à l'ébullition. Ces substances ne sont pas coagulables ; elles sont partiellement précipitées par l'alcool, le sublimé, le tannin acétique, l'acide phosphomolybdique et l'acide phosphotungstique. On les dénomme *albumoses* quand elles proviennent des albumines, *globuloses* lorsqu'elles dérivent de globulines.

On les divise d'autre part en *protéoses vraies* qui sont totalement précipitées, comme les protéines, par le sulfate d'ammonium saturé à l'ébullition, par l'acide picrique ou l'acide trichloracétique et en *peptones* qui ne sont pas précipitées dans les mêmes conditions ; la plus grande simplicité de la molécule de ces substances se traduit par le fait qu'elles sont susceptibles de traverser des membranes qui arrêtent les protéines.

Les protéoses peuvent exister à l'état libre chez les végétaux ; on a isolé par exemple une albumose de la graine du Lupin ; quant aux peptones, elles abondent dans les graines en voie de germination : on en a bien signalé aussi avant la germination, mais il n'est pas démontré qu'elles ne sont pas dues à une diastase qui interviendrait pendant les opérations de l'extraction.

Produits de décomposition des protéines simples. — Les protéoses ne constituent qu'un premier terme de la décomposition des substances protéiques ; si elle se poursuit on arrive à des substances relativement simples, qu'il est très important de considérer.

Schützenberger, en traitant des protéines à l'auto-

clave, en présence d'eau et de baryte, a obtenu en particulier de l'urée $CO\begin{cases}AzH^2\\AzH^2\end{cases}$ et de l'oxamide $\begin{matrix}COAzH^2\\|\\COAzH^2\end{matrix}$, ce qui l'a conduit à considérer les protéines comme dérivant de l'urée et constituant des *uréides*. En présence d'une faible quantité de baryte, il obtenait un peu d'acides aminés.

Fischer et Kossel hydrolysèrent les protéines avec des acides minéraux tels que l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique à 25 p. 100; ils ont été amenés à les regarder comme des *guanéides*, c'est-à-dire comme des dérivés de la guanidine

$$AzH=C\begin{cases}AzH^2\\AzH^2\end{cases}$$

Ils obtenaient en outre des acides aminés, des sels ammoniacaux, des corps non azotés et une substance noire humique. Mais ce sont surtout les travaux de Fischer qui nous ont renseigné sur la manière dont se disloquent les protéines ; nous dirons un mot plus loin du principe de la méthode employée, examinons tout d'abord les différentes catégories qui dérivent ainsi de la décomposition des protéines et qui se trouvent d'ailleurs à l'état naturel chez les végétaux.

Acides aminés. — Ce sont des corps à fonctions acide et basique associées comme dans les protéines suivant le schéma $-CH\begin{cases}AzH^2\\COOH\end{cases}$. Une méthode générale, due à Sörensen, permet de doser l'azote ainsi

engagé à l'état de fonction *amine*; elle consiste à faire agir le formol qui bloque le groupement aminé suivant la réaction :

$$R - CH\begin{matrix}\diagup AzH^2 \\ \diagdown COOH\end{matrix} + H.COH = R - CH\begin{matrix}\diagup Az = CH^2 \\ \diagdown COOH\end{matrix} + H^2O$$

conduisant à la formation d'un dérivé méthylénique qui se comporte comme un acide énergique ; il suffit d'évaluer l'acidité qui se manifeste ainsi pour se rendre compte de la quantité d'azote aminé.

Chodat a proposé pour les acides aminés une réaction microchimique, s'appliquant d'ailleurs aux peptones et aux protéines, et qui consiste en l'obtention d'une coloration bleue ou violette en présence de tyrosinase et de paracrésol.

On peut distinguer parmi les acides aminés deux grands groupes, les acides monoaminés et les acides diaminés ; les premiers ne sont pas précipitables par l'acide phosphotungstique alors que les seconds le sont ; ils peuvent être d'autre part monobasiques ou bibasiques.

a. Acides monoaminés monobasiques

Ce sont :

1° Le *glycocolle* ou acide amino-acétique $CH^2.AzH^2 - CO^2H$; il est soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool ; sa solution acquiert une coloration rouge en présence du perchlorure de fer ; il donne avec les sels de cuivre une combinaison pouvant cristalliser.

La *sarcosine* est un méthylglycocolle $CH^3.AzH - CH^2 - CO^2H$.

La *bétaïne* est un triméthyglycocolle $OH - Az - \overset{\overset{|||}{(CH^3)^3}}{CH^2} - CO^2H$.

Ces trois acides aminés ont été rencontrés chez les végétaux, mais c'est surtout la bétaïne qui est répandue (Betterave, *Lycium barbarum*, graines de *Vicia sativa*, de Cotonnier...) ; elle apparaît fréquemment dans la décomposition des matières organiques.

L'*acide hippurique* n'est autre chose que le benzoate de glycocolle

$$C^6H^5 - CO - CH^2.AzH - CO^2H$$

2° L'*alanine* est l'acide α aminoproprionique $CH^3 - CH.AzH^2 - CO^2H$; elle donne une coloration jaune avec l'acide sulfurique et le formol.

La *phénylalanine*, qui se rencontre dans les graines de Lupins jaune et blanc, dans celles de Soja et de Courge en voie de germination a pour formule

$$C^6H^5 - CH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$$

3° La *tyrosine* est un dérivé de la phénylalanine ; c'est l'acide paraoxyphénylaminopropionique $OH.C^6H^4 - CH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$; elle est très fréquente dans le règne végétal ; on l'a signalée dans les graines de Courge, de Lupin, de Vesce en voie de germination, dans les fruits du Sureau, dans les Pommes, dans les tubercules de Dahlia, de Betterave, de Pomme de terre ; elle accompagne souvent la leucine dans la décomposition des protéines par les alcalis ; très peu soluble dans l'eau, elle est soluble dans l'alcool

ammoniacal ; elle cristallise en fines aiguilles soyeuses (fig. 13).

Sous l'action d'une diastase oxydante, la tyrosinase, nous avons constaté antérieurement qu'elle s'oxyde et

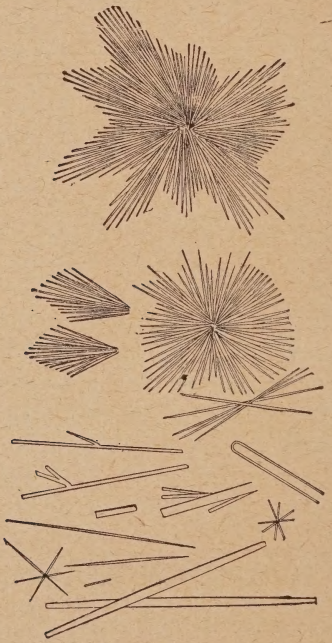


Fig. 13. — Cristaux de tyrosine.

noircit ; il se produit de l'ammoniaque, du gaz carbonique et de l'acide homogentisique

$$C^9H^{11}AzO^3 + O^2 = C^8H^8O^4 + AzH^3 + CO^2$$

qui est une hydroquinone-acétique $C^6H^3(OH)^2 - CH^2$

— CO^2H ; c'est cette réaction qui explique le noircissement des Pommes sectionnées à l'air.

Nous avons signalé, à propos des protéines, la réaction que donne la tyrosine avec le réactif de Millon et qui peut servir à déceler microchimiquement cet acide aminé. On peut également employer à ce sujet certaines des propriétés que nous venons de reconnaître à la tyrosine. Si on pratique des coupes dans de jeunes feuilles étiolées de Pomme de terre, qu'on les traite entre lame et lamelle par l'alcool et qu'on laisse ce solvant s'évaporer, on constate qu'il se forme sur les bords de la lamelle des cristaux d'asparagine et de tyrosine, ces derniers reconnaissables à leur aspect de fines aiguilles souvent groupées en pinceaux et au fait qu'ils restent inaltérés dans une solution concentrée à chaud de tyrosine, alors que les cristaux d'asparagine disparaissent. Ils se dissolvent difficilement dans l'eau, sont insolubles dans l'acétone et l'éther, assez solubles dans l'ammoniaque, les alcalis ou leurs carbonates ainsi que dans les acides minéraux étendus.

4° La *valine* est l'acide aminovalérianique

$$(CH^3)^2 = CH - CHAzH^2 - CO^2H$$

On l'a observée dans les plantules de Haricot et de Vesce.

5° La *leucine* ou acide aminocaproïque a pour formule

$$CH^3 - (CH^2)^3 - CHAzH^2 - CO^2H$$

C'est avec la tyrosine l'acide aminé le plus fréquent et le plus abondant chez les végétaux ; on l'a signalée

dans les graines en voie de germination de Courge et de différentes Légumineuses (*Vicia, Phaseolus, Glycine, Lupinus, Pisum...*), dans les bourgeons de Pomme de terre, dans la Canne à sucre, dans les feuilles de *Chenopodium album*, dans les mélasses de Betterave.

Fig. 14.
Cristaux de leucine.

Elle cristallise en lamelles incolores souvent groupées en sphérules (fig. 14), peu solubles dans l'eau ; elle a la propriété de se sublimer ; si on s'adresse par exemple à des plantules de Dahlia laissées plusieurs jours à l'obscurité, qu'on y pratique des coupes et qu'on soumette celles-ci à la dessiccation et qu'on les chauffe ensuite dans un petit tube, on obtient par sublimation des cristaux de leucine. La leucine forme avec les sels de cuivre des agrégats aciculaires très difficilement solubles.

b. Acides monoaminés basiques

Ce sont surtout l'acide aspartique et l'acide glutamique.

L'*acide aspartique* est l'acide aminosuccinique

$$CO^2H - CH.AzH^2 - CH^2 - CO^2H$$

Il est surtout important en raison de ses relations avec l'asparagine ; on l'a rencontré dans certaines

graines, mais il provient peut-être dans ce cas de l'action de l'eau chaude qui a servi à traiter les graines sur l'asparagine. Il donne avec les sels de plomb une combinaison cristallisée en aiguilles ; de même en présence d'acétate de cuivre il se produit une combinaison organométallique.

L'*asparagine* est une amide de l'acide aspartique ; elle possède donc à la fois les fonctions acide, amine et amide $COAzH^2$ et sa formule est

$$COAzH^2 — CH^2 — CHAzH^2 — CO^2H$$

Elle possède un carbone asymétrique et peut par conséquent être lévogyre, dextrogyre ou racémique ; la plus répandue est l'asparagine gauche. Elle se trouve en dissolution dans le suc cellulaire de nombreuses plantes, Asperge, Betterave, Guimauve, Scorsonère, Réglisse, Vesce et graines de nombreuses Légumineuses en voie de germination ; des plantules étiolées de Lupin en contiennent jusqu'à 20 p. 100 du poids de leur substance sèche ; un litre de jus de vesce étiolée en fournit 40 grammes.

L'asparagine précipite de sa solution par l'alcool et cristallise en prismes rhombiques hémiédriques ; elle donne avec l'acétate de cuivre un précipité cristallin bleu ciel. Portée à l'ébullition en présence d'alcalis ou d'acides elle donne de l'ammoniaque et de l'acide aspartique ; c'est la propriété qu'on utilise pour doser l'azote à l'état amidé ; on n'a qu'à déplacer ensuite et à doser l'ammoniaque qui en provient.

L'acide nitreux transforme l'asparagine en acide malique $CO^2H — CHOH — CH^2 — CO^2H$; elle fer-

mente en liqueur neutre en donnant de l'acide succinique $CO^2H - CH^2 - CH^2 - CO^2H$.

L'asparagine est l'acide aminé qui se reconnaît le plus aisément par voie microchimique ; il suffit de pratiquer des coupes dans l'axe hypocotylé d'un Lupin ayant germé à l'obscurité et de les porter dans l'alcool ou dans la glycérine pure pour qu'au bout d'un cer-

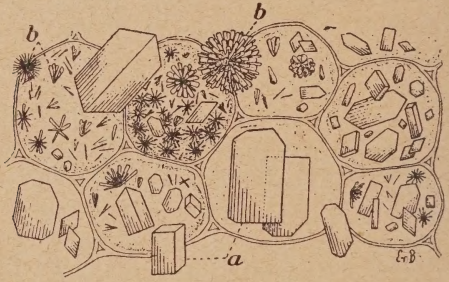


Fig. 15. — Parenchyme de l'axe hypocotylé de Lupin après séjour dans la glycérine pure; il s'est constitué des cristaux volumineux *a* d'asparigine et des sphérocristaux *b* de leucine.

tain temps l'asparagine apparaisse à l'état de cristaux caractéristiques (fig. 15), incolores, solubles dans l'eau et présentant de belles couleurs de polarisation. A 100°, température à laquelle ils perdent leur eau de cristallisation, ils prennent la forme de gouttelettes d'aspect oléagineux, très réfrigérentes, restant solubles dans l'eau ; à 200° les gouttelettes brunissent et cessent de se dissoudre dans l'eau.

Les cristaux ne sont pas solubles dans une solution concentrée d'asparagine, ce qui permet de les distinguer des cristaux d'azotate de potassium avec lesquels on pourrait les confondre à un simple exa-

men morphologique ; d'autre part ils ne présentent pas la réaction caractéristique des nitrates, consistant en une coloration bleue qui apparaît sous l'action de l'acide sulfurique et de la diphénylamine.

L'*acide glutamique* est l'acide aminoglutarique

$$CO^2H - (CH^2)^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$$

Il est très répandu chez les végétaux (racine de Betterave, plantules de Courge), coexistant souvent avec l'asparagine. On le prépare facilement par l'hydrolyse acide du gluten.

La *glutamine* est l'amide de l'acide glutamique

$$CO.AzH^2 - (CH^2)^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$$

Comme l'asparagine, elle est très fréquente, la remplace chez certaines plantes ou coexiste avec elle, les deux acides aminés se trouvant d'ailleurs en proportions très variables avec les diverses espèces.

c. Acides aminosulfurés

Leur rôle en physiologie végétale est beaucoup moins important que celui des substances précédentes ; contentons-nous de citer :

La *cystéine* ou acide α aminothiolactique

$$CH.SH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H$$

et la *cystine* ou acide diaminothiolactique de formule

$$\begin{array}{l} CSH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H \\ | \\ CSH^2 - CH.AzH^2 - CO^2H \end{array}$$

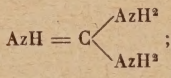
ce dernier étant d'ailleurs un premier exemple d'acides diaminés.

d. Acides diaminés

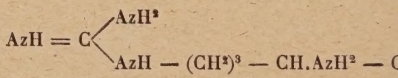
Dans ce groupe qui correspond à des substances précipitables par l'acide phosphotungstique viennent se ranger :

La *lysine* ou acide diaminocaproïque $CH^2.AzH^2 — (CH^2)^3 — CH.AzH^2 — CO^2H$; c'est donc de la leucine aminée ;

et l'*arginine* ou guanéide oxyaminovalérique ; c'est dire que c'est un dérivé de la guanidine



sa formule peut s'écrire

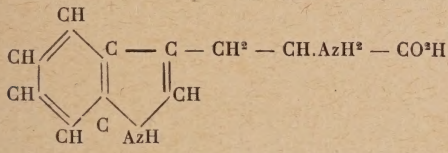


On rencontre l'arginine dans les cotylédons de Lupin germés et étiolés ; par l'action de l'arginase elle donne de l'urée et de l'*ornithine* (acide diamino-valérique).

Pour Kossel la lysine et l'arginine, ainsi que l'histidine dont il va être question, c'est-à-dire les substances désignées sous le nom de *bases hexoniques* à six atomes de carbone, constitueraient le noyau fondamental des protéines.

e. Acides aminés hétérocycliques

C'est tout d'abord le *tryptophane*, dont il a déjà été parlé à propos des réactions colorées des protéines, qui est une indolalanine et dont la formule



comprend un noyau pyrrol

Par dédoublement le tryptophane donne naissance à l'indol et au scatol ou méthylindol. Il se produit dans la digestion triptyque des protéines ; il donne la réaction glyoxylique ; à l'état libre il se colore en rouge violacé par l'eau de brome.

Nous retrouverons la présence de l'*indol* dans les organes de certaines plantes supérieures, sous la forme de combinaisons aboutissant au bleu d'indigo ; mais il peut aussi exister à l'état libre, par exemple dans les fleurs de Jasmin, de *Citrus*, de Caféier, dans la spathe de certains *Caladium* et le bois de *Celtis reticulosa*.

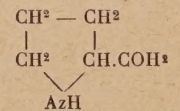
On peut le mettre en évidence microchimiquement par la réaction de Werschaffelt ; celle-ci consiste à placer sous une petite cloche une fleur fraîche de *Jasminum Sambac* par exemple, au-dessus d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution concentrée d'acide oxalique ; au bout d'une demi-heure environ on voit

apparaître dans le voisinage de la fleur une coloration rose qui va en augmentant d'intensité et passe au violet. On peut aussi employer la réaction d'Ehrlich ; elle correspond à l'emploi d'une solution alcoolique à 2 p. 100 de diméthylaminobenzaldéhyde ; on en ajoute 1/2 volume à la solution supposée contenir de l'indol ; on verse au bout de dix minutes goutte à goutte de l'acide chlorhydrique à 25 p. 100 ; il se produit une coloration rouge qui est encore sensible pour une concentration d'indol de l'ordre de $1 : 10^6$.

De même une solution d'indol donne avec l'ammoniaque et le nitrite de sodium un précipité rouge de nitrate de nitrosoindol.

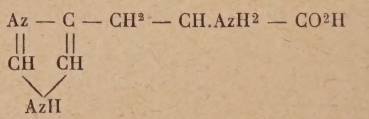
Le *scatol* se rencontre aussi dans certains végétaux supérieurs, en particulier dans le bois de *Celtis reticulosa* ; ce bois pulvérisé et distillé en présence de vapeur d'eau donne un liquide qui, par le réactif d'Ehrlich, se colore en violet ; avec l'acide nitrique et le nitrite de sodium il se forme un précipité bleu foncé.

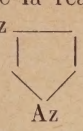
La *proline* a pour formule



c'est donc un acide dérivé du pyrrol ; on l'a observé dans les plantules de Lupin et de Vesce.

L'*histidine*



qui présente la réaction du biuret, dérive du noyau imidazol  ; on la rencontre avec la lysine et l'arginine dans les graines germées de Lupin, de Courge, de Soja, de diverses Crucifères, dans les tubercules de Pomme de terre, etc.

f. Urée et uréides

Signalons enfin, à la suite des différents groupes d'acides aminés et comme produits de la décomposition des substances protéiques, l'urée et ses dérivés.

L'*urée*, diamide de l'acide carbonique $CO\begin{matrix}AzH^2\\AzH^2\end{matrix}$, a été signalée à plusieurs reprises chez les Champignons (*Penicillium, Aspergillus)*, puis chez de nombreuses plantes supérieures (Fosse) (Navet, Carotte, Trèfle, Fève, Chicorée, Epinard, Blé...); il en existe environ 0 gr. 65 dans 1 kilo de substance sèche de Pois âgés d'un mois.

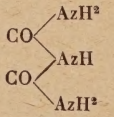
On peut la précipiter des sucs végétaux, au moyen du xanthydrol ou diphénopyrazol de formule $\left[CH\begin{matrix}C^6H^4\\C^6H^4\end{matrix}O\right]^2 = O$, sous forme d'urée dixanthylée.

Elle provient des protéines par oxydation ; Fosse regarde l'urée comme provenant de l'acide cyanique CAzOH, qui se forme lui-même lorsqu'on vient à oxyder les protéines, ou les hydrates de carbone en présence d'ammoniaque ; le permanganate de potas-

sium donne de l'acide cyanhydrique, puis de l'acide cyanique et enfin de l'urée lorsqu'on le fait agir sur un mélange d'ammoniaque et d'aldéhyde formique.

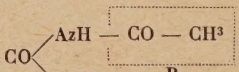
Par hydratation, elle donne naissance au carbonate d'ammonium $CO\begin{matrix}O.AzH^4\\O.AzH^4\end{matrix}$ et cette transformation est en particulier réalisée par le *Micrococcus ureæ*.

Chauffée l'urée fond, puis perd de l'ammoniaque et aboutit au biuret



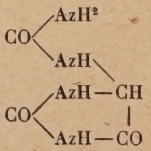
qui, avec le sulfate de cuivre, en présence d'alcali, donne une coloration pourpre.

Les *uréides* sont des amides de l'urée ; ils correspondent à la formule générale

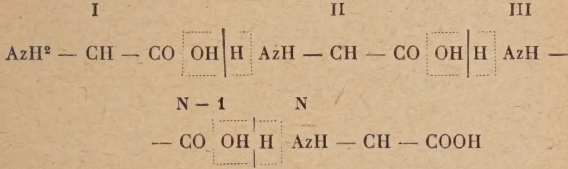


R étant un reste de molécule acide ; si la substitution s'effectue deux fois, soit par rapport à l'urée, soit par rapport au reste acide on a un diuréide.

L'*allantoïne*, qu'on rencontre dans les bourgeons de Platane, dans les racines du Marronnier, est un diuréide glyoxylique :



Polypeptides. — La nature des produits de décomposition des protéines nous montre que par des actions graduées on passe de celles-ci aux protéoses, aux peptones, puis aux différents acides aminés. Les travaux de FISCHER ont établi d'autre part qu'il est possible d'effectuer la synthèse de substances intermédiaires entre les peptones, qui sont encore assez complexes, et les acides aminés ; il s'agit des *polypeptides* qui résultent de la combinaison de deux ou plusieurs molécules d'acides aminés suivant le schéma



On peut par exemple combiner l'alanine et le glycocolle ; il se forme de l'eau et de la glycylalanine ; on obtient ainsi des di-tri-... polypeptides ; à partir des tétrapeptides les substances obtenues possèdent la réaction du biuret ; elles sont précipitées par l'acide phosphomolybdique ; le suc pancréatique les dédouble en acides aminés ; on est donc déjà en présence de réactions propres aux protéines.

Des polypeptides bien caractérisés ont d'autre part été obtenus à partir des protéines de graines ; c'est ainsi qu'OSBORNE a obtenu un dipeptide, combinaison de la proline et de la phénylalanine, en décomposant la gliadine par une ébullition prolongée en présence de 25 p. 100 d'acide sulfurique ; la substance donne de beaux cristaux et forme une combinaison cuprique.

De même Fischer et Abderhalden ont obtenu l'*acide leucylglutaminique* à partir de la gliadine par une hydrolyse partielle en présence d'acide sulfurique à 70 p. 100.

Ces produits de décomposition sont en tout semblables à ceux qu'on obtient par synthèse et on conçoit que ces résultats constituent un progrès considérable en ce qui concerne la connaissance de la structure chimique des substances protéiques ; celles-ci nous apparaissent, en résumé, comme se constituant progressivement à partir des acides aminés par la combinaison de ces derniers entre eux ; les peptones ne sont que des polypeptides de poids moléculaire assez élevé qui, par une nouvelle addition de molécules d'acides aminés, donnent les protéoses, puis les protéines. Nous retrouvons ici, entre les acides aminés et les protéines, les mêmes rapports que ceux que nous avons vus exister entre les sucres les plus simples, les sucres réducteurs, et les polysaccharides les plus complexes, tels que l'amidon et les celluloses.

Proportions des différentes fonctions azotées contenues dans les protéines. — Les différentes substances que nous venons de reconnaître comme résultant de la décomposition des protéines n'entrent pas dans la constitution de celles-ci en proportion constante ; on en a déjà une démonstration quand on cherche à déterminer les proportions relatives des différentes fonctions azotées entrant dans la molécule des protéines. Ayant déterminé par la méthode de Kjeldahl la quantité d'azote total d'une protéine, on peut ensuite évaluer les quantités respectives

d'azote engagé soit dans des fonctions amines (azote aminé et diaminé), ou des fonctions amides (azote amidé).

Le principe de cette détermination repose sur le fait, signalé à propos de l'asparagine, que par une faible hydrolyse acide l'azote amidé est facilement transformé en ammoniaque qui peut être ensuite déplacé par la magnésie. Une autre portion de l'azote restant peut être précipité par l'acide phosphotungstique ; il s'agit de l'azote correspondant aux acides diaminés (lysine, arginine, histidine) ; dans le liquide filtré ne subsiste que les acides monoaminés dont le taux d'azote peut être évalué par la méthode de Sörensen ou celle de Kjeldahl ; les acides aminés sont d'ailleurs susceptibles d'être isolés par distillation fractionnée de leurs éthers éthyliques (Fischer). On obtient ainsi pour 100 de protéine les taux d'azote suivants (Osborne) :

	Azote total	Azote amidé	Azote monoaminé	Azote diaminé
Globuline du Blé . .	18,4	1,4	9,8	6,8
Edestine (Chanvre) .	18,6	1,9	10,8	5,9
Zéine (Maïs)	16,1	3	12,5	0,5
Légumine	18	1,7	10,9	5,2
Leucosine.	16,9	1,2	11,8	3,5
Gluténine.	17,5	3,3	11,9	2
Gliadine	17,7	4,2	12,4	1

Si l'azote monoaminé est en proportion assez constante on voit par contre que les taux d'azote amidé et d'azote diaminé sont assez variables.

Des analyses permettant de déterminer la nature spécifique des différentes substances dérivant de la dislocation des protéines amènent à une constatation

identique ; qu'il nous suffise de rapporter les nombres suivants qui expriment la teneur de quelques substances protéiques végétales en les divers acides aminés :

	Léguméline	Edestine	Gliadine	Zéine
Glycocolle.	0,5	3,8	0	0
Alanine.	0,9	3,6	2	9
Tyrosine	1,5	3,1	1,2	3,5
Valine	0,7	6,2	0,2	»
Leucine.	9,6	**14,4**	5,6	**18**
Acide aspartique. . .	4,1	3,3	0,6	1,7
Acide glutamique. .	**12,9**	12,35	**37,3**	**26,2**
Lysine	3	2	0	0
Arginine	5,4	**14,4**	3,2	1,3

C. Protéines conjuguées ou protéides

Ce dernier groupe de protéines comprend des substances qui, par des actions assez faibles, se décomposent en une protéine simple et en un corps non protéique qui constitue, pour la protéide considérée, ce qu'on est convenu d'appeler le *groupe prosthétique* ; il s'agit de substances protéiques qui sont souvent le plus importantes au point de vue quantitatif ; c'est ainsi que dans le plasmode d'*Æthalium septicum* il existe 45 p. 100 de protéides et seulement 15 p. 100 de protéines simples. Suivant la nature de la substance prosthétique, on distingue les *nucléoprotéides* et les *glycoprotéides*.

a. Nucléoprotéides

Il s'agit des substances fondamentales du noyau et du nucléole, en particulier de la chromatine dont on connaît la propriété d'absorber différentes matières

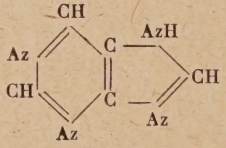
colorantes, propriété sur laquelle sont basées les techniques histologiques. Leur groupe prosthétique est constitué par une nucléine, c'est-à-dire une substance qui donne par décomposition de l'acide phosphorique. Elles sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les alcalis. Elles sont précipitées de ces dernières solutions par l'acide chlorhydrique ou l'acide acétique, le précipité se redissolvant d'ailleurs dans un excès d'acide. Coagulables à l'ébullition, elles offrent les réactions colorées des protéines simples ; la pepsine les transforme en protéoses solubles et en une nucléine insoluble.

Les *nucléines* sont insolubles dans l'eau, l'alcool et l'éther ; elles sont solubles dans les alcalis dilués (1 p. 1000) ; elles offrent encore les réactions des protéines. Les alcalis les dédoublent en une protéine et en acide nucléique ; ce sont donc encore des protéides et les nucléoprotéides doivent être considérés comme des diprotéides ; la première molécule de protéine, qui est enlevée par la pepsine, est plus faiblement fixée que la seconde, qui n'est libérée que par les alcalis.

Les *acides nucléiques* ne renferment pas de soufre, mais une grande proportion de phosphore (environ 10 p. 100) ; il y en a environ 2 p. 100 dans les nucléoprotéides et 5 p. 100 dans les nucléines. Ces substances précipitent les protéines de leurs solutions et ce précipité a toutes les propriétés des nucléines. L'acide nucléique isolé de la Levure de bière aurait comme formule la plus simple $C^{40}H^{59}Az^{14}O^{22}$, $2P^2O^5$; on n'obtient pas la réaction du biuret avec les acides nucléiques.

Les acides minéraux dilués les décomposent à l'ébullition en donnant naissance à de l'acide phosphorique, un groupement sucré tels que des pentoses et de l'acide lévulique, des bases nucléiniques, encore appelées bases xanthiques ou puriques, des bases pyrimidiques.

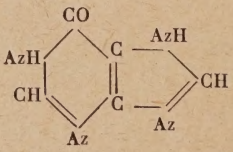
Les **bases xanthiques** sont des dérivés de la purine qui a pour formule



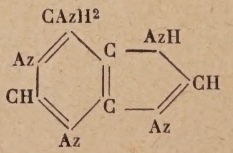
et se trouve constituée par l'accolement de deux noyaux, le noyau pyrimidique représenté à gauche et le noyau imidazol, déjà rencontré dans l'histidine.

Ces bases précipitent à l'état de combinaisons cupriques par le sulfate de cuivre, en présence de bisulfite de sodium et comprennent les substances suivantes :

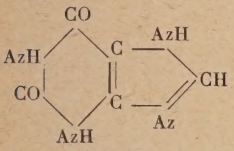
L'*hypoxanthine* ou *sarcine*, qui est une oxypurine



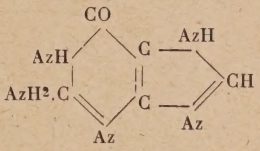
L'*adénine* est une aminopurine



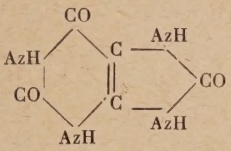
La *xanthine* est une dioxypurine, la *guanine* une amino-oxypurine ; enfin l'*acide urique* est une trioxypurine ; leurs formules peuvent s'écrire comme il suit :



Xanthine



Guanine



Acide urique

Ces différentes substances, sauf l'acide urique, peuvent se rencontrer chez les végétaux supérieurs ; la xanthine, par exemple, est assez abondante dans la graine de Lupin et d'Orge en voie de germination (fig. 16 et 17), ainsi que dans le thé ; nous verrons plus tard que, parmi les substances qui nous sont connues sous le nom d'alcaloïdes, il en est qui dérivent très simplement des bases puriques.

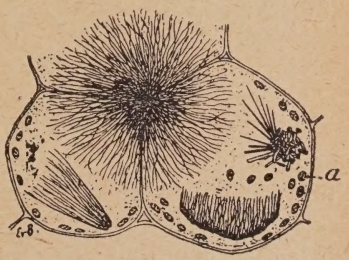
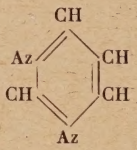


Fig. 16. — Jeune tige de Pois chiche, après séjour dans la glycérine pure, montrant des aiguilles flexueuses de xanthine.

Il en est de même des **bases pyrimidiques** qui dérivent de la pyrimidine



Elles sont d'ailleurs moins importantes que les précédentes et comprennent surtout la *cystosine* qui est une amino-oxypyrimidine et la *thymine* qui est une méthyldioxypyrimidine.

Les nucléines peuvent exister à l'état libre dans les cellules ; elles se rencontrent surtout dans le noyau et certaines contiennent du fer ; c'est ainsi que l'embryon d'Orge contient de ce fait 0,2 p. 100 de fer.

Fig. 17. — Cristaux de chlorhydrate de xanthine.

Rappelons ici l'existence chez les animaux de protéides particuliers ; il s'agit de phosphoprotéides dont le groupe prosthétique est constitué par un noyau phosphoré, différent d'ailleurs des acides nucléiques, et dont le type est constitué par la caséine du lait ; ce groupe ne paraît pas représenté dans le règne végétal ; lorsqu'on a trouvé du phosphore dans les substances protéiques végétales autres que les nucléoprotéides il est toujours apparu comme une impureté et disparaît par des précipitations répétées.

b. Glycoprotéides

Ce sont des substances colloïdales dont les solutions sont filantes et mousseuses et qui, traitées par la vapeur d'eau surchauffée, donnent naissance à des protéoses et, comme corps prosthétiques, à des sucres. Du fait de la présence de ces dernières substances les glycoprotéides présentent la réaction de Molisch, c'est-à-dire que, traitées par l'acide sulfurique concentré et quelques gouttes d'une solution alcoolique d'α naphtol, elles donnent une coloration violette qui devient jaune par l'addition d'alcool, d'éther ou de soude ; avec le thymol on a dans les mêmes conditions une coloration carmin.

D'autre part le noyau protéique communique aux glycoprotéides les réactions des protéines simples.

Ces substances sont solubles dans les alcalis très étendus ; elles sont précipitées de ces dernières solutions par l'acide acétique ou l'alcool. Représentées chez les animaux par les *mucines* elles existent aussi chez les plantes ; on a isolé des mucines des tubercules de la Pomme de terre et de *Dioscoræa*.

c. Les protéines et leurs dérivés chez les Thallophytes

Les Bactéries et les Champignons contiennent essentiellement les mêmes protéines que les végétaux supérieurs, venant se placer dans les groupes des albumines, des globulines, des nucléoprotéides et des mucines ; leur taux est d'ailleurs souvent beaucoup plus élevé que chez les plantes vasculaires ; c'est ainsi

que chez certaines Bactéries elle peut atteindre 56 p. 100 du poids de substance sèche (Bacille de Koch), 63 p. 100 (associations des bactéries de la putréfaction), et même 79,8 (Bacille de la pneumonie); elle est d'ailleurs très variable avec la nature du milieu nutritif et peut subir une diminution de 20 p. 100 quand les bactéries sont cultivées sur un milieu riche en substances sucrées, mais pauvre en protéines. Chez l'*Azotobacter chroococcum* le taux en protéines est au contraire assez faible, 18 p. 100, alors que les hydrates de carbone représentent la majeure partie du poids des cellules.

Les protéines des Bactéries donnent naissance aux mêmes dérivés que celles que nous avons considérées, et en particulier aux acides mono- et diaminés; on retrouve aussi fréquemment chez ces êtres les dérivés des acides nucléiques et en particulier les bases xanthiques; c'est ainsi qu'on a extrait du bacille de Koch une nucléine donnant naissance à un acide tuberculique qui contient 9,5 p. 100 de phosphore et qui se transforme en guanine, adénine et xanthine.

Dans différentes espèces de Bactéries, on a signalé des corpuscules sphériques paraissant être de nature nucléique; il s'agit des grains de *volutine*, observés tout d'abord dans le *Spirillum undulans*, se colorant énergiquement par le bleu de méthylène et considérés par plusieurs auteurs comme constituant une substance de réserve (corpuscules métachromatiques). Ces corps sont plus réfringents que le reste du cytoplasme; très lentement solubles dans l'eau ils sont insolubles dans l'alcool et l'éther; les alcalis et leurs carbonates les dissolvent, ainsi que les acides

minéraux ; ils se colorent en jaune par l'iode et ne donnent aucune réaction avec le réactif de Millon ni avec la liqueur cupropotassique ; en dehors du bleu de méthylène, le rouge de ruthénium peut être utilisé pour les reconnaître ; car ils se colorent alors en un rouge intense. Très répandue chez les Bactéries, la volutine se retrouve dans les différents groupes de Champignons et d'Algues.

Les Champignons eux aussi sont riches en matières protéiques ; 100 de matière sèche contiennent de 24 (*Hydnum repandum*) à 45 (*Psalliota campestris*, Levures) et même 55 (*Bovista*) de protéines ; cela correspond à une teneur en azote total de 7 à 12 p. 100 de matière sèche. Diverses analyses nous renseignent sur la proportion des différentes formes sur lesquelles l'azote correspondant à cette teneur globale se trouve engagé ; on a par exemple pour le *Boletus edulis*

23,1 p. 100 de protéines
0,15 — d'ammoniaque
3,4 — d'acides aminés } évalués en asparagine.
5,6 — — amidés }

et, pour le *Penicillium glaucum*, qui contient 30 p. 100 de protéines, les quantités suivantes d'azote correspondant aux différentes catégories de substances, rapportées à 100 d'azote total :

39,4 d'azote protéique
40,7 — nucléique
19,9 — ammoniacal, aminé ou amidé.

On observe fréquemment chez les Champignons des acides aminés libres ; ce sont par exemple la leucine (Ergot de seigle, Agaricinées), la tyrosine (Agaricinées), l'histidine et l'arginine.

Les Levures sont particulièrement riches en nucléoprotéides aboutissant à des bases xanthiques ; elles présentent aussi des mucines.

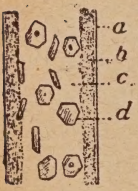


Fig. 18.—Tube sporangifère de *Mucor*, présentant des cristalloïdes protéiques *d*.

On a observé chez plusieurs espèces de Champignons des cristaux protéiques ; c'est le cas de la *mucorine* qui se trouve dans les pédicelles sporangifères de diverses Mucorinées (fig. 18), telles que le *Pilobolus*. La question a été posée de savoir si les cristaux colorés de phycoérythrine et de phycocyanine obtenus à partir de certaines Algues ne rentreraient pas dans le groupe spécial des protéines formé par les hémoglobines animales.

CHAPITRE II

NUTRITION AZOTÉE DES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

1. Différentes sources d'azote

Au point de vue de la nature de leurs sources d'azote les plantes se distinguent, comme pour la nutrition carbonée, en deux grandes catégories, les plantes vertes ou *autotrophes* et les plantes dépourvues de chlorophylle ou *hétérotrophes* ; en ce qui concerne ces dernières, qui sont saprophytes ou parasites, les sources d'azote et de carbone sont constituées avant tout par des substances organiques qui peuvent être assez complexes. Quant à l'évolution des idées relatives à l'origine des substances azotées des végétaux chlorophylliens elle a été la même que pour le carbone ; on crut d'abord que la matière noire du sol, l'humus, était la seule source d'azote ; Liebig (1840) fit ensuite prévaloir la théorie d'une nutrition exclusivement minérale ; pour lui les seules sources d'azote sont l'ammoniaque et l'acide azotique. Ce sont tout d'abord ces substances dont nous étudierons la formation et l'utilisation par les plantes ; nous montrerons ensuite que l'azote peut être utilisé dans une certaine mesure par les plantes vertes, comme cela est

normal pour les végétaux dépourvus de chlorophylle, à partir de composés organiques plus ou moins complexes, c'est-à-dire qu'on ne doit pas accepter la théorie de LIEBIG dans toute sa rigueur; nous envisagerons enfin la question si longtemps controversée de l'assimilation de l'azote libre.

A. Azote ammoniacal

L'ammoniaque du sol a pour origine la transformation des matières azotées complexes, animales ou végétales; celles-ci subissent une dégradation successive, s'opérant par échelons, et qui est l'œuvre de microorganismes; nous la considérerons plus loin. La teneur en ammoniaque des différents sols n'est d'ailleurs jamais bien considérable; elle varie, pour 1 kilo de terre desséchée, de 1 à 25 milligrammes vers la surface; elle diminue, puis s'annule en profondeur. Le dosage de l'ammoniaque s'effectue facilement par son déplacement à l'ébullition à l'aide de la magnésie calcinée et en la recevant sur de l'acide sulfurique titré; qualitativement on la reconnait par le réactif de NESSLER (iodure double de mercure et de potassium) qui donne avec l'ammoniaque une coloration jaune.

Il existe aussi de l'ammoniaque dans l'air où il peut constituer une source d'azote pour les végétaux. En faisant barboter de l'air dans de l'acide sulfurique dilué SCHLŒSING a montré qu'à Paris, il existait environ 2 mgr. 3 d'ammoniaque dans 100 mètres cubes d'air; cette moyenne journalière correspond à une teneur de 1 mgr. 1 pendant le jour et de 3 milligrammes pendant la nuit.

La teneur de l'air en ammoniaque se montre essentiellement variable avec les diverses conditions atmosphériques ; la direction du vent présente à cet égard une grande importance ; ce sont les vents du Nord-Ouest qui abaissent le plus la proportion d'ammoniaque, ceux du Sud-Est se trouvant au contraire les plus favorables ; la pluie appauvrit l'air en ammoniaque qui se trouve entraînée avec l'eau. Schlœsing voyait l'origine de l'ammoniaque de l'air dans une réduction des nitrates s'effectuant dans les parties profondes de la mer ; de là il admettait un dégagement dans l'air et un transport qui aboutissait à la fixation de l'ammoniaque sur la terre arable où nous verrons qu'elle se transforme à son tour en nitrates ; ceux-ci sont enfin entraînés en partie par les eaux d'infiltration et se rendent à la mer.

Ces considérations ont été émises à une époque où elles avaient une grande importance pour la compréhension du cycle de l'azote, parce que l'on ignorait la possibilité de la fixation de l'azote gazeux par les végétaux.

L'ammoniaque existe dans l'air surtout à l'état de carbonate d'ammonium et d'azotate d'ammonium qui s'y trouvent sous forme de très fines particules solides ; ces substances sont entraînées à la surface du sol par les pluies ; on constate en fait que l'eau de pluie peut contenir 1 mgr. 86 d'ammoniaque par litre. De plus le sol peut absorber directement l'ammoniaque de l'air, et le calcul montre qu'un hectare de terre arrive à recevoir de la sorte annuellement plusieurs kilos (50 par exemple) d'ammoniaque.

Utilisation de l'ammoniaque. — L'ammoniaque qui existe dans l'air et dans le sol peut être absorbée par les plantes supérieures et être utilisée par elles.

Ammoniaque de l'air. — Les feuilles tout d'abord sont capables d'absorber l'ammoniaque de l'air ; Sachs le montra pour la première fois en enfermant des tiges de Haricot, laissées en relation avec la plante, dans des cloches contenant, l'une de l'air chargé de gaz carbonique, l'autre la même atmosphère dans laquelle on faisait se dégager un peu d'ammoniaque provenant de la dissociation d'une solution étendue de carbonate d'ammonium ; Sachs constatait que la tige, qui était enfermée dans cette seconde cloche, acquérait un poids de substance sèche, un poids de cendres et un poids d'azote plus considérables que l'autre ; les nombres qu'il donne sont les suivants :

	Substance sèche (*g*)	Cendres	Azote
	—	—	—
CO^2	4,140	0,616	0,106
$CO^2 + AzH^3$	6,740	1,078	0,208

100 de substance sèche contiennent donc dans le premier cas 2,56 d'azote et dans le second 3,10 d'azote.

Schloesing (1874) a repris ces expériences en plaçant la partie aérienne de plants de Tabac sous des cloches renfermant ou non des vapeurs d'ammoniaque ; les résultats de l'analyse de l'azote sont donnés par le tableau qui suit :

	Azote p. 100 de substance sèche	
	0 AzH^3	AzH^3
	—	—
Limbes.	2,62	3,18
Tiges, pétioles, grosses nervures.	1,62	2,08
Racines.	1,09	1,33

L'azote a donc augmenté dans la cloche où se dégageait de l'ammoniaque ; cette augmentation correspondait d'ailleurs à une récolte plus abondante (147 gr. de matière sèche au lieu de 139 gr.) et l'azote supplémentaire ne se retrouvait dans la plante ni à l'état d'ammoniaque, ni à celui d'acide azotique, ni enfin sous forme de nicotine ; il fallait donc admettre que cet azote avait servi à élaborer des matières protéiques.

L'ammoniaque était fourni aux feuilles à l'état gazeux directement, ou à l'état de solution très diluée de carbonate d'ammonium.

A. Mayer a obtenu à la même époque des résultats identiques pour d'autres plantes (Chou-rave, Pois, Blé). Les expériences ont été réalisées soit à l'air libre, dans de l'air contenant des vapeurs ammoniacales, dans de l'air entièrement dépourvu d'ammoniaque, soit en humectant les feuilles avec de l'eau pure ou avec une solution très étendue de carbonate d'ammonium ; les plantes végétaient sur des solutions aqueuses parfaitement exemptes de tout composé azoté ; voici quelques résultats obtenus par A. Mayer en ce qui concerne le Chou-rave :

		Substance sèche	Azote
Sous cloche .	o AzH^3	o gr. 715	13 mgr.
	AzH^3	1 — 592	38 —

Il en a été de même pour le Pois :

		Substance sèche	Azote
Plante. . . .	Embryon	o gr. 235	11 mgr.
	o AzH^3	o — 241	15 —
	AzH^3	o — 560	22 —

Il n'est pas douteux, d'après tous ces résultats, que les plantes vertes absorbent l'ammoniaque qui est à leur disposition dans l'air, qu'elle s'y trouve à l'état gazeux ou qu'elle soit entraînée par les eaux de pluie à la surface même de la feuille.

Ammoniaque du sol. — Pour mettre en évidence l'utilisation par les plantes de l'ammoniaque du sol il est nécesaire de se mettre à l'abri d'une cause d'erreur fondamentale, celle qui résulte du phénomène de la nitrification, que nous étudierons ultérieurement, et qui consiste dans la transformation de l'ammoniaque en azote nitrique ; cette nitrification étant l'œuvre de bactéries, il est nécessaire que les cultures soient aseptiques, et c'est ce qui fait que toutes les expériences de cultures ordinaires étaient insuffisantes pour donner la démonstration de l'utilisation directe des sels ammoniacaux.

Les premières expériences dans cet ordre d'idées sont dues à Müntz ; il prenait de la terre privée de toute trace d'azotate par des lavages, l'additionnait d'une certaine quantité de sulfate d'ammonium et la stérilisait dans de grands pots à la température de 100° ; on partait ainsi d'un milieu ne contenant pas de nitrate et qu'on pouvait supposer débarrassé de tout microorganisme ; les pots étaient placés dans de grandes cages à parois vitrées ou formées de toiles métalliques glycérinées, destinées à empêcher l'accès de spores par l'air ; enfin les graines étaient stérilisées par une courte immersion dans l'eau bouillante ; les arrosages avaient lieu avec de l'eau également stérilisée.

Müntz constatait qu'à la fin de la culture il n'y avait pas d'azotate dans la terre et il obtenait les résultats suivants, relatifs aux quantités d'azote contenues dans les plantes, comparées à celles des graines et du sel ammoniacal introduit dans les cultures :

	Azote des graines	Azote des plantes développées	Azote emprunté au sel ammoniacal
Maïs	3	211	208
Fève	37	956	919
Féverolle. .	16	105	88
Orge	0,7	50	49
Chanvre . .	0,5	115	115

Les deux premières plantes présentaient un développement très intense et elles atteignaient 1 mètre de haut.

Toute une série d'expériences de cette nature, faites par différents auteurs, ont donné des résultats identiques ; mais il était nécessaire, d'après ce qu'on sait maintenant, relativement aux techniques d'asepsie, de reprendre ces expériences avec des précautions plus grandes ; le fait qu'il n'y avait pas de nitrate dans la terre à la fin de l'expérience ne prouve pas d'ailleurs qu'il ne s'en est pas formé, mais que, s'il s'en est produit, il a été absorbé par la plante. Mazé a refait des cultures de Maïs en présence de sulfate d'ammonium en milieux parfaitement aseptiques ; les graines étaient stérilisées au sublimé et les plantes étaient rigoureusement maintenues à l'abri des germes pendant toute l'expérience ; au bout de quarante-cinq jours on obtenait, pour le Maïs, les gains d'azote suivants :

1 p. 1000 de sulfate d'ammonium . . 232 mgr.
0,5 p. 1000 — — . . 265 —

Les expériences une fois terminées, les solutions ont été conservées pendant deux mois ; au bout de ce temps la réaction de Nessler (iodomercurate de potassium) est aussi nette qu'au début ; la réaction est nulle au contraire avec la diphénylamine et l'acide sulfurique ; il n'y a donc pas d'azotate formé, comme ce serait le cas s'il y avait des microorganismes nitrificateurs.

On constate d'autre part que le rendement est plus considérable à la dose de 0,5 p. 1000 qu'à la dose de 1 p. 1000 ; c'est que l'action des sels ammoniacaux devient rapidement nocive, comme en témoigne l'aspect des racines lorsque la concentration du sel d'ammonium augmente ; la chose est surtout très nette pour le carbonate d'ammonium et on a tout d'abord rapporté le phénomène à la réaction alcaline du sel en question ; nous reviendrons tout à l'heure sur ce point, quand il s'agira de comparer l'utilisation de l'azote fourni sous forme ammoniacale et de l'azote des nitrates.

On peut d'autre part mettre en évidence la formation de substances azotées organiques, à partir des sels ammoniacaux ; c'est ainsi qu'avec des plantules d'orge étiolées, placées sur de l'eau ou sur une solution de chlorure d'ammonium à 1 p. 100, Kinoshita a obtenu les taux suivants des différentes formes d'azote pour des cultures d'une semaine :

	Eau		AzH^4Cl	
Acide total	3,5 p. 100		4,43 p. 100	
Azote protéique . . .	2,70	3,36	2,13	4,16
Azote de l'asparagine .	0,66		2,03	

L'azote total a augmenté en présence du chlorure d'ammonium et l'ensemble de l'azote protéique et de

l'asparagine apparaît de son côté comme ayant subi une notable augmentation.

Engrais ammoniacaux. — Ces résultats de laboratoire expliquent l'emploi en agriculture des sels ammoniacaux comme engrais ; ceux-ci peuvent bien être dans le sol transformés en nitrates par un phénomène biologique auquel nous avons déjà été amenés à faire allusion, mais une partie est susceptible d'être utilisée directement.

Le sel d'ammonium le plus employé comme engrais est le sulfate, dont la majeure partie provient des eaux de lavage du gaz d'éclairage ; on a utilisé aussi le *crud ammoniac*, résidu de l'épuration du gaz, contenant du sulfate d'ammonium, du sulfucyanure et du cyanure d'ammonium, de l'ammoniaque libre, du bleu de Prusse et du soufre libre ; de même le sel de Burkheiser, constitué par 2/3 de sulfate et 1/3 de sulfite d'ammonium, est un produit secondaire résultant de la purification du gaz d'éclairage et se comporte comme un engrais sans action nocive, le sulfite se transformant rapidement en sulfate dans le sol.

Avec le nitrate d'ammonium on fournit au sol une source d'azote à la fois ammoniacale et nitrée, mais ce sel est d'un emploi assez limité en agriculture.

Les nouveaux procédés aboutissant à la synthèse industrielle de l'ammoniaque, à partir de l'azote de l'air, peuvent être appelés à jouer un grand rôle en agriculture, puisqu'ils s'adressent à un réservoir inépuisable d'azote. Il s'agit du procédé Haber qui permet la combinaison directe de l'azote et de l'hydrogène en présence d'un catalyseur, tel que l'osmium, à

une pression de 200 atmosphères et à une température de 500°. Dans le procédé SERPEK, lié à la fabrication de l'aluminium, on prépare d'abord au four électrique à 1500° un azoture d'aluminium en faisant passer un courant d'azote sur un mélange d'alumine ou de bauxite et de carbone

$$Al^2O^3 + 3C + Az^2 = 2AlAz + 3CO$$

puis on décompose l'azoture formé en traitant à l'autoclave avec une lessive de soude

$$2AlAz + 2NaOH + 2H^2O = Al^2Na^2O^4 + 2AzH^3$$

B. Azote nitrique

L'ammoniaque peut donc être assimilée directement par les plantes supérieures, mais en fait, elle est souvent transformée dans le sol en acide nitrique qui est neutralisé par le carbonate de calcium et c'est sous cette forme que l'azote est le plus communément absorbé par les végétaux.

L'existence des nitrates se reconnaît aisément par la coloration bleue qu'ils donnent en présence de l'acide sulfurique et de la diphénylamine ; ils se distinguent des nitrites qui présentent également cette réaction en ce qu'ils sont insensibles au réactif de TROMSDORFF (solution d'amidon additionnée d'iodure de potassium) qui donne avec les nitrites une coloration bleue de l'amidon par mise en liberté de l'iode.

La meilleure méthode pour le dosage des nitrates consiste à les transformer en bioxyde d'azote par l'action d'un sel ferreux et à évaluer volumétriquement le gaz qui se dégage (fig. 19).

Nous étudierons plus loin la manière dont s'effectue la transformation de l'ammoniaque en acide nitrique ; signalons rapidement une autre cause accessoire de production d'acide azotique. On a reconnu que dans l'air il existe un peu d'acide nitrique, en quantités

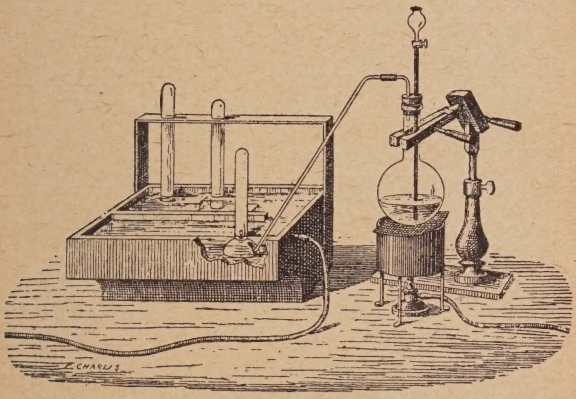


Fig. 19.— Dosage de l'azote nitrique par la méthode de Schlœsing.

assez minimes, de l'ordre de celles qui se rapportent à l'ammoniaque, et qui peut être, comme cette dernière substance, entraîné par les eaux de pluie ; on constate que dans cette eau l'azote total est représenté en moyenne par 76 p. 100 d'azote ammoniacal et 24 p. 100 d'acide nitrique.

L'acide nitrique existe surtout dans l'air à l'état de poussières de nitrate d'ammonium, accompagné d'un peu de nitrite d'ammonium ; acide nitrique et acide nitreux résulteraient de la combinaison de l'azote et de l'oxygène de l'air sous l'action de l'électricité atmosphérique, en présence de vapeur d'eau.

De nombreuses expériences ont établi que l'acide nitrique constitue, dans les conditions normales, la meilleure forme sous laquelle l'azote est assimilé ; rappelons par exemple les résultats obtenus par Boussingault (1860-61); des graines d'*Helianthus argophyllus* étaient semées dans un sol stérile additionné ou non de différentes doses d'un azotate auquel on ajoutait ou non d'autres engrais non azotés ; les rendements en substance sèche, au bout de quatre-vingt-six jours, c'est-à-dire les différences entre la matière sèche de la plante obtenue et celle de la graine, sont donnés par le tableau qui suit :

Lots		Rendements (gr.).
Pas d'engrais non azoté	1. 0 Nitrate de potassium .	0,397
	2. 0,02 p. 100 — .	0,720
	3. 0,04 — — .	1,130
	4. 0,16 — — .	3,280
Cendres	5. Nitrate de potassium	21,111
Phosphate	6. Carbonate de potassium . . .	0,291

Dans le lot n° 5 on obtenait une très grande plante (70 cm.), arrivant à fleur ; dans tous les autres, les plantes restaient naines et chétives ; pour le lot n° 6 la taille était de 12 centimètres ; la substance organique n'augmente plus chez ces dernières au bout d'un temps assez court et à partir de ce moment elle ne fait que se déplacer des organes les plus âgés vers les plus jeunes. L'expérience nous montre donc la nécessité de l'association d'un certain nombre de composés minéraux pour le développement normal des plantes, nécessité sur laquelle nous nous sommes étendus antérieurement.

La comparaison des lots n° 5 et n° 6, nous montre d'autre part que l'azotate ne peut être remplacé par les autres substances mises à la disposition de la plante; enfin, et c'est là surtout ce que nous avons à retenir pour l'instant, nous constatons que dans les quatre premiers lots le rendement est sensiblement proportionnel à la quantité de nitrate fourni.

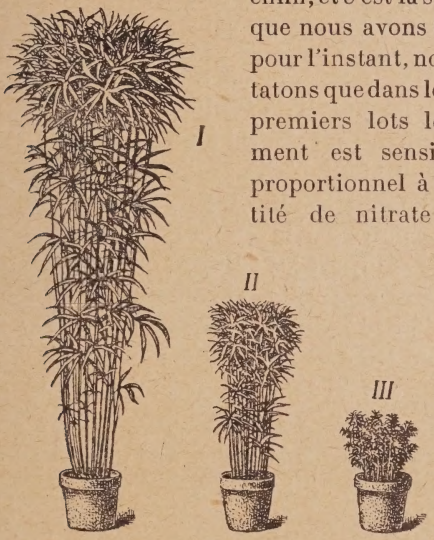


Fig. 20. — Cultures de Chanvre.

I, avec l'engrais complet; II, avec le même engrais sans azote
III, sans engrais.

Des expériences semblables ont été reproduites un très grand nombre de fois, dans des conditions très variées et sur des plantes diverses. Rapportons quelques résultats qui mettent hors de doute la nécessité d'un engrais azoté pour le développement normal des végétaux supérieurs et l'utilisation des nitrates (fig. 20). Opérant sur la Betterave cultivée en sol arti-

ficiel (sable siliceux, terre calcaire et argileuse) Dehérain a obtenu comme récoltes :

Sol témoin	111 gr.
$(PO^4)^2Ca^3 + KCl$	225 —
$(PO^4)^2Ca^3 + KCl + AzO^3Na$	1777 —

De même Hellriegel et Wilfarth ont bien mis en évidence la proportionnalité qui s'établit entre la quantité de nitrate fourni à une Graminée et la quantité de substance sèche produite ; le développement des plantes (il s'agissait de l'Orge Chevalier) a été évalué en outre par le nombre de fruits formés et par leur poids moyen ; les cultures ont été faites dans des vases de verre, sur un sol constitué par du sable calciné, mélangé à du carbonate de calcium et imbibé d'une solution de phosphate de calcium, chlorure de potassium et sulfate de magnésium.

$(AzO^3)^2Ca$ (gr.)	Substance sèche (gr.)	Nombre de fruits	Poids moyen des fruits (mgr.)
0	0,415	3	14,8
0,164	2,995	43	24,2
0,328	5,594	78	27,9
0,656	10,805	124	32,8
0,984	16,388	194	31,8
1,312	21,074	263	30,8
1,968	29,343	306	33,9

Des expériences plus récentes dans lesquelles on s'est mis à l'abri des causes d'erreur pouvant exister dans les précédentes (présence de microorganismes pouvant décomposer les nitrates...) ont donné les mêmes résultats ; c'est ainsi que Mazé a obtenu pour le Maïs, au bout de trente-cinq jours de culture dans des solutions aseptiques contenant 1 p. 1000 ou 0,5

p. 1000 de nitrate de sodium, les rendements suivants en azote (mgr.) :

Nitrate de sodium	Azote utilisé
1 p. 1000	197 mgr.
0,5 p. 100	181 —

Rappelons qu'avec les mêmes doses de sulfate d'ammonium les résultats étaient inverses, que le rendement était le plus grand en présence de la concentration la plus faible du sel ammoniacal. Les nitrates nous apparaissent donc comme constituant la source de choix d'azote pour les végétaux supérieurs, du moins comme nous le verrons plus loin, dans les conditions des expériences relatées.

Nous envisagerons bientôt la question relative à la transformation de l'azote nitrique en azote protéique ; elle est plus ou moins rapide suivant les plantes et pour certaines d'entre elles il se produit une accumulation préalable des nitrates ; c'est ce qui se produit d'une manière particulièrement nette dans le Tabac, la Pomme de terre, divers *Chenopodium*, l'Ortie... ; dans les feuilles de la Pomme de terre on trouve 1,5 à 2,8 de nitrates p. 100 de matière sèche ; cette teneur atteint 15 p. 100 dans certains *Amarantus*. Ces nitrates proviennent d'ailleurs bien du sol, car on ne les observe plus quand le sol ne contient pas de matières nitrées.

Engrais nitrés. — La pratique a d'ailleurs mis en évidence depuis longtemps l'efficacité des nitrates sur la végétation et c'est à cette notion, qui n'a été que précisée par la suite dans les travaux de laboratoire, que correspond l'emploi des nitrates comme engrais

le plus utilisé est le nitrate de soude, provenant du Chili et qui a pour origine un phénomène d'ordre biologique que nous envisagerons plus loin.

Le nitrate de potassium se forme aussi spontanément dans certains pays dans des conditions semblables à celles qui président à la formation du nitrate de sodium du Chili; on l'obtient d'autre part par double décomposition du nitrate de soude et du chlorure de potassium des mines de Stassfurth.

Le nitrate d'ammonium est d'un usage réduit comme engrais.

Le nitrate de calcium mérite une mention particulière, en raison de son origine ; il s'agit en effet d'une substance qui résulte de la synthèse de l'acide nitrique à partir de l'azote de l'air et dont la source est par suite indéfinie ; c'est à Notodden, en Norvège, que fut réalisée pour la première fois (1905) cette synthèse suivant un procédé dû à Berkeland et Eyde; il est basé sur l'oxydation de l'azote de l'air dans l'arc voltaïque en présence d'eau et d'un excès d'oxygène ; l'acide nitrique formé réagit sur du calcaire pour produire le nitrate de calcium.

Enfin on fournit indirectement de l'azote nitrique aux végétaux supérieurs en introduisant dans le sol des substances organiques, telles que le fumier, qui se transforment successivement pour aboutir à la formation d'ammoniaque puis d'acide nitrique.

Comparaison de la valeur alimentaire de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique. — D'après ce qui vient d'être dit ces deux sources d'azote sont assimi-

lables, mais les expériences réalisées d'une manière comparative nous ont montré que les nitrates constituent une source d'azote meilleure que les composés ammoniacaux ; il est nécessaire de revenir sur ce point ; pratiquement la conclusion à laquelle nous sommes arrivés est exacte, théoriquement elle ne l'est pas. C'est qu'il intervient dans l'utilisation des sels par la plante un phénomène d'élection qualitative dont nous avons eu l'occasion de parler antérieurement à propos de la nutrition minérale, que nous retrouvons pour les sels ammoniacaux ou les nitrates, et qui crée des conditions secondaires ayant une répercussion sur le développement de la plante ; les travaux récents de Prianichnikov le mettent nettement en évidence.

Supposons que nous donnions à un végétal comme source d'azote du sulfate d'ammonium ou du chlorure d'ammonium ; l'ammoniaque se trouve absorbée et il s'accumule dans la solution de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique ; le liquide acquiert donc une acidité qui va en augmentant et qui ne tarde pas à être assez forte pour nuire à la végétation ; on peut dans ces conditions être amené à conclure que les sels ammoniacaux sont moins alimentaires que les nitrates ; mais c'est à l'*acidité physiologique* du sel employé qu'il faut rapporter ce fait. On le montre facilement en faisant disparaître cette condition accessoire ; il suffit par exemple d'ajouter au liquide nutritif du carbonate de calcium ; dans des expériences ainsi conduites Prianichnikov a obtenu, pour les quantités d'asparagine formée par des plantules étiolées de Vesce ou de Maïs, les

nombres suivants qui renseignent sur l'assimilation de l'azote :

	Eau	$(AzO^3)^2Ca$	$AzH^4Cl + CO^3Ca$
Vicia sativa . .	221	247,6	263
Zea Mays . . .	104,5	160,7	269,5

On voit donc qu'en présence de carbonate de calcium, le chlorure d'ammonium constitue une source d'azote bien meilleure que le nitrate de calcium.

Cette question de l'utilisation comparée de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique avait déjà été abordée par différents auteurs qui avaient mis en évidence l'intervention possible du calcaire dans les résultats obtenus. C'est ainsi que Wagner, faisant des cultures de Betterave dans un sol pauvre en calcaire et dans un autre riche au contraire en carbonate de calcium, avait montré que dans le premier cas la récolte était beaucoup moins élevée avec un sel ammoniacal qu'avec un nitrate et que dans le second cas les développements étaient au contraire très comparables :

Engrais azoté	Pas de calcaire	Calcaire
0	6,3	9,6
2 gr. azote nitrique	94,4	92
2 gr. azote ammoniacal . .	29,4	86,7

Les diverses plantes se montrent d'ailleurs sensibles à des degrés très variables à l'acidité du milieu ; alors que les Graminées la supportent relativement bien, il est de toute nécessité d'ajouter du calcaire dans le cas des Légumineuses (fig. 21).

Prianichnikov a employé une autre méthode pour éviter l'accumulation d'acide dans le liquide ; elle

consiste à renouveler ce dernier; on constate par

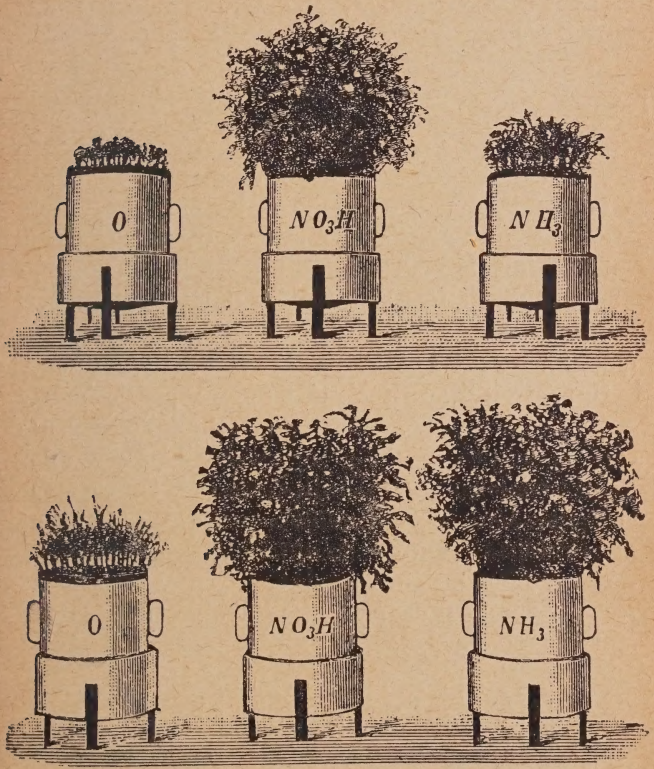


Fig. 21. — Développement comparé d'une Légumineuse à laquelle il n'est fourni aucune source d'azote combiné (O), ou à la disposition de laquelle on met un nitrate (NO_3H) ou un sel ammoniacal (NH_3); le sol étant pauvre en calcaire (figures du haut) ou riche au contraire en calcaire (figures du bas).

exemple avec l'Orge une influence très heureuse de

cette manière d'opérer, le sulfate d'ammonium étant la source d'azote employée ; les récoltes sont représentées par les nombres qui suivent :

	Solution non renouvelée	Solution renouvelée 2 fois par semaine
1re expérience	1,66	9,39
2e —	1,61	8,70

La plante change d'ailleurs la réaction du liquide avec une vitesse telle que le renouvellement de la solution, même réalisé tous les jours, est insuffisant pour empêcher une acidification notable ; dans certains cas celle-ci peut correspondre, pour vingt-quatre heures, à 3 unités P_H.

Un autre dispositif a été employé par le même auteur, qui consiste à diviser les racines d'une plante en deux parties, à faire plonger l'une dans une solution ne contenant que la source d'azote, l'autre étant en contact d'un second liquide dans lequel se trouvent dissous tous les autres sels nutritifs. Dans ces conditions on obtient, pour les poids moyens de substance sèche élaborée par des plantules d'Avoine, les nombres ci-dessous :

	$SO^4(AzH^4)^2$	AzO^3Na
Solution non renouvelée .	1,65	6,17
Solution renouvelée . . .	7,18	10,43

Ces résultats montrent dans quelle large mesure le renouvellement de la solution favorise le développement en ce qui concerne le sulfate d'ammonium ; cette opération est également profitable dans le cas du nitrate de sodium ; cela tient à ce qu'avec ce sel il

se produit aussi un changement de réaction du liquide, d'ailleurs en sens inverse du précédent ; le liquide a une tendance à s'alcaliniser ; alors que la valeur de P_H passe par exemple de 6,2 à 3,3 pour le sulfate d'ammonium, elle passe de 6,2 à 7,3, dans les mêmes conditions, dans le cas du nitrate de sodium. De plus la production de gaz carbonique par les racines des plantes en expérience transforme la soude qui devient libre en bicarbonate de sodium et il en résulte que l'alcalinité physiologique du nitrate de sodium agit moins sur le développement des plantes que l'acidité physiologique des sels ammoniacaux à acides forts.

Ces résultats ont amené Prianichnikov à se demander si le carbonate d'ammonium, dont l'acide est particulièrement inoffensif pour les plantes, n'agirait pas beaucoup moins par les conditions secondaires qui se trouvent réalisées électivement. Si plusieurs auteurs avaient reconnu pour ce sel un effet rapidement nocif cela tient à ce que le sel employé n'était pas une combinaison bien déterminée, mais un mélange de combinaisons d'ammoniaque, de gaz carbonique et d'acide carbamique $AzH^2.CO^2H$.

Prianichnikov s'est adressé au sel cristallisé dans un courant de gaz carbonique et il a constaté qu'il se montrait plus favorable, pour le développement des plantes, que tous les autres sels d'ammonium, même le phosphate monoammonique.

C'est ainsi qu'avec une concentration faible $\left(\frac{1}{1000}N\right)$ on obtient pour les différents sels d'ammonium les

longueurs suivantes, pour les racines du Pois, au bout de temps égaux :

	AzH^4Cl	$PO^4H^2AzH^4$	$CO^3.H.AzH^4$
Accroissement moyen.	1 cm. 85	1 cm. 83	2 cm. 83

Les résultats sont encore plus favorables quand on fait passer un courant de gaz carbonique dans la solution, avant de la diluer :

	$CO^3.H.AzH^4$	$CO^3.H.AzH^4 + CO^2$
P_H	7,3	6,8
Accroissement moyen.	0 cm. 48	1 cm. 43

Donnons encore les résultats d'une expérience qui met en évidence l'action de divers sels ammoniacaux, employés à des concentrations variées, sur l'accroissement des tiges et des racines de Pois (douze jours d'expérience) :

Dilutio s	LONGUEUR DES TIGES (cm.)			LONGUEUR DES RACINES (cm.)		
	$\frac{N}{1000}$	$\frac{3N}{1000}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{1000}$	$\frac{3N}{1000}$	$\frac{N}{100}$
$CO^3.H.AzH^4 + CO^2$	9,7	5,8	5,5	10,6	7,5	5,7
CO^3HAzH^4	5,8	5,0	5,5	8	6,6	3,7
$PO^4H^2AzH^4$	5,0	5,1	5,2	9,2	8,4	6,6
AzH^4Cl	4,1	4,1	4,1	7,6	7,4	3,8

Dans l'eau distillée la longueur des tiges était de 4 cm. 3, celle des racines de 8 cm. 1.

Si on vient à donner aux plantes supérieures l'azote sous forme de nitrate d'ammonium on constate encore

une élection des deux constituants et c'est l'ammoniaque qui est utilisée le plus rapidement, si bien qu'il s'accumule dans le liquide de l'acide nitrique, comme cela a lieu pour les cultures de Champignons tels que le *Sterigmatocystis nigra*.

D'après tous ces résultats l'ammoniaque paraît se comporter comme une source d'azote toujours supérieure à celle que constituent les nitrates, à condition toutefois que la réaction du milieu n'introduise pas un élément de trouble, et la chose nous apparaîtra logique lorsque nous aurons reconnu que les nitrates absorbés doivent, avant de servir à l'élaboration des matières protéiques, être transformées en ammoniaque. Si en agriculture on observe un parallélisme très frappant entre l'énergie de production des nitrates dans le sol et le développement des plantes, les causes de ce parallélisme sont de nature secondaire ; tout ce qui empêche la formation d'acide nitrique dans le sol, et nous verrons que c'est en particulier le cas pour l'acidité du sol et une aération insuffisante, empêche en même temps le développement des plantes supérieures.

Azote nitreux. — Certaines expériences ont eu pour but de rechercher si les nitrites sont capables d'être utilisés par les plantes supérieures ; Molisch (1887) a constaté qu'ils peuvent l'être lorsqu'ils existent en faible concentration, mais qu'ils deviennent très toxiques à une dose un peu élevée. Treboux (1904) a rapporté cette toxicité à la réaction acide du milieu et arrive à la conclusion qu'elle disparaît lorsque les solutions sont neutres ou faiblement alcalines ; l'azote

nitreux deviendrait même alors plus alimentaire que l'azote nitrique.

L'utilisation possible des nitrites par les plantes agricoles a pris une certaine importance pratique à la suite de l'emploi comme engrais du nitrate de calcium, qui contient toujours un peu de nitrite de calcium. C'est ainsi que Schloesing fils fut appelé à étudier l'action comparée du nitrite de sodium ou de calcium purs d'une part et des nitrates d'autre part; la conclusion fut que l'efficacité des différents sels employés est de tout point comparable; les nombres suivants le démontrent suffisamment; ils se rapportent à des cultures de Maïs effectuées dans des vases contenant 9 kilos de terre à laquelle on ajoutait 0 gr. 405 d'anhydride phosphorique sous forme de superphosphate, 1 gr. 5 de potassium et 0 gr. 2 d'azote sous les différentes formes que nous venons de rapporter :

	Récolte
Vase témoin	43,3
Nitrite de sodium	54,6
— de calcium	54,6
Azotate de sodium	54,2
— de calcium	54

C. Azote organique

En ce qui concerne les plantes vasculaires pourvues de chlorophylle, la question s'est posée d'une manière relativement récente de savoir si elles peuvent absorber par leurs racines et utiliser certaines matières organiques azotées, c'est-à-dire de savoir si la théorie de la nutrition purement minérale des

plantes supérieures était aussi exclusive que l'avait formulé Liebig.

Lefèvre a montré qu'en inanition de gaz carbonique les acides aminés tels que le glycocolle, l'alanine, la tyrosine déterminaient une augmentation du poids de la matière sèche ; mais les précautions d'aseptie prises par l'auteur paraissent insuffisantes et, si les substances qui étaient fournies aux plantes ont amené un rendement appréciable, cela peut tenir à la production de gaz carbonique à leurs dépens ; elles interviendraient alors d'une manière indirecte comme source de carbone et non d'azote ; ce dernier corps n'a d'ailleurs pas été dosé dans le sol ni dans les plantes obtenues.

De son côté, Lutz a conclu de ces expériences que les amines les plus simples étaient utilisées par le Maïs et la Courge ; la méthylamine CH^3AzH^2, la diméthylamine $(CH^3)^2AzH$, la triméthylamine $(CH^3)^3Az$, constitueraient pour cet auteur des sources d'azote ; reprenant ces expériences avec le Radis, je n'ai pu qu'observer la nocivité de ces substances ; mais j'ai montré que cette dernière plante peut utiliser un assez grand nombre de substances azotées organiques, en employant le procédé de culture rigoureusement aseptique que j'ai décrit antérieurement à propos de l'utilisation par les plantes supérieures de substances organiques ternaires. C'est ainsi que l'asparagine et le glycocolle augmentent le poids de substance sèche d'une manière très appréciable par rapport aux cultures privées de tout corps azoté ; de plus on peut se rendre compte que la quantité d'azote protéique a augmenté, comme le montrent

les nombres qui suivent et qui se rapportent à une plante :

		Azote total	Azote protéique
Plantule.	Amande	0 mgr. 68	0 mgr. 12
	O Azote	0 — 57	0 — 36
	Asparagine 1 p. 100.	6 — 19	1 — 34
	Glycocolle 0,1 p. 100.	2 — 01	1 — 11

On voit de plus que la plante à qui on n'a fourni aucune substance azotée perd un peu de son azote pendant la germination.

La leucine est également alimentaire ; la tyrosine peut être aussi utilisée, mais elle est rapidement nocive, comme il arrive d'ailleurs pour toutes les substances contenant un groupement aromatique ; les peptones se comportent également comme une source d'azote ; l'urée est un très bon aliment pour le Radis ; l'acide hippurique, qui contient un radical cyclique, se comporte au contraire comme une substance toxique ; parmi les diverses substances sur lesquelles j'ai fait porter mes recherches c'est l'acide urique, sous forme d'urate de sodium, qui s'est montré le meilleur aliment azoté.

Voici d'ailleurs quelques nombres qui donnent, pour des cultures âgées de six semaines, les augmentations de substance sèche vis-à-vis d'une plante provenant d'une graine de même poids et à qui on ne fournissait aucune substance azotée :

	mgr.		mgr.
Chlorure d'ammonium.	41,7	Urée	22
Azotate de sodium	36,5	Xanthine	3,7
Asparagine	21,4	Allantoïne	42,5
Glycocolle	21,4	Urate de sodium	51,2

Toutes ces substances étaient fournies à la dose de 0,1 p. 100.

Ajoutons que l'acide cyanhydrique et le cyanure de sodium constituent également pour le Radis une source d'azote ; les rendements qu'ils déterminent dans les conditions des expériences précédentes sont en moyenne de 15 milligrammes.

V. Bialosouknia a montré que c'est surtout en présence de sucre que se fait l'utilisation de l'urée, du glycocolle, de l'alanine et de la leucine par le *Brassica Napus* et le *Sinapis alba*.

Par contre, les substances protéiques ne se sont jamais comportées comme alimentaires.

Ces résultats, obtenus dans des conditions artificielles, posent la question de l'utilisation par les plantes supérieures de l'azote organique qui se trouve dans le sol. D'après Boussingault 1 kilog de terre arable contient en moyenne

Azote organique.	1 430 mgr.
— ammoniacal.	4 —
— nitrique	40 —

L'azote engagé dans des combinaisons organiques et provenant des déchets animaux et végétaux est donc très prédominant ; c'est surtout dans la matière complexe noire constituée par l'humus que l'azote existe en dehors des combinaisons ammoniacales et nitriques. Cet humus, sous l'action des acides ou des bases étendues, dégage de l'ammoniaque et ce fait conduit à considérer l'azote qu'il renferme comme existant surtout à l'état amidé. L'humus contient de 2,5 à 6,5 p. 100 d'azote, mais on n'a pu

séparer jusqu'à présent la matière azotée de la substance ternaire (acide humique) à laquelle elle est associée.

Opérant sur la tourbe du Michigan et la traitant par l'acide chlorhydrique, Joddi a pu caractériser parmi les produits de décomposition l'ammoniaque, des acides amidés ainsi que des acides mono- et diaminés ; de son côté Robinson a pu isoler de sols tourbeux deux acides aminés bien connus, la leucine et l'isoleucine ; l'humus apparaît donc comme constitué par une matière noire résultant de la transformation des substances ternaires des végétaux dont elle provient et par des substances azotées semblables à celles que nous avons vu dériver des substances protéiques.

Il n'existe pas d'ailleurs dans l'humus que des matières résultant de la dislocation des protéines ; celles-ci peuvent contribuer elles-mêmes pour une part importante à la constitution de la matière azotée et correspondent à l'existence d'êtres vivants, ceux-là même qui sont les agents de désintégration de l'humus. Dans les feuilles de Chêne tombées depuis un an Kosttyschew a trouvé 2,98 p. 100 d'azote total, dont 2,73 p. 100 correspondaient à des matières protéiques et seulement 0,25 p. 100 à des composés plus simples ; ces résultats amènent à considérer le sol comme un milieu essentiellement vivant, notion sur laquelle nous serons amenés à nous étendre plus longuement.

Les végétaux supérieurs ne semblent pas d'ailleurs utiliser d'une manière sensible les diverses formes d'azote organique contenues dans l'humus ; ces com-

binaisons se trouvent être surtout utilisées par des plantes hétérotrophes telles que les Champignons qui libèrent de l'ammoniaque à partir d'elles ; cette

Fig. 22. — Racine de Hêtre contractant une association avec le mycélium d'un Champignon *(mycorhize)*.

ammoniaque, qui peut d'ailleurs être transformée en acide nitrique, constitue un aliment azoté pour les végétaux supérieurs ; cette action indirecte de l'humus

est bien mise en évidence par le phénomène des « ronds de Sorcière » ; il s'agit de la disposition présentée par plusieurs espèces de Basidiomycètes, en particulier par le *Marasmius Oreades*, qui développent leurs appareils sporifères successifs suivant des cercles concentriques ; dans la zone où apparaissent les organes reproducteurs, la végétation est complètement desséchée du fait d'un abondant développement dans le sol de filaments mycéliens ; immédiatement en dehors de cette région, la végétation phanérogamique apparaît au contraire beaucoup plus luxuriante que partout ailleurs ; les plantes sont plus grandes, leur teinte verte est accentuée ; il s'agit d'une zone où se développent en profondeur les nouveaux filaments mycéliens qui agissent sur l'humus en produisant de l'ammoniaque.

Faisons remarquer que les plantes supérieures humicoles contractent souvent par leurs racines des associations avec des Champignons, formant ce qu'on appelle des *mycorhizes* (fig. 22) ; on a été amené à considérer les filaments mycéliens contribuant à former cette symbiose comme étant précisément un intermédiaire entre l'humus et la plante supérieure au point de vue des échanges d'azote ; c'est une question sur laquelle nous aurons à revenir.

La pratique du chaulage qui favorise la formation d'ammoniaque dans le sol paraît bien correspondre à une décomposition purement chimique de la matière de l'humus analogue à celle que nous venons de signaler comme se produisant sous l'action des acides ou des alcalis. Boussingault avait déjà montré que les quantités d'ammoniaque formées dans une terre

chaulée varient avec la proportion de chaux employée et avec la durée de contact :

Chaux par kg. de terre	Durée de contact	Ammoniaque
—	—	—
0	1 mois	5 mgr.
0 gr. 3	6 jours	12 —
10 —	2 jours	34 —
10 —	1 mois	76 —
10 —	2 mois	79 —

D. Fixation de l'azote libre par les végétaux supérieurs

Si on cherche à faire le bilan de l'azote combiné qui est fourni au sol et celui que consomment les végétaux, on arrive à la conclusion qu'il doit exister pour ceux-ci une autre source d'azote que celles que nous venons d'envisager.

L'acide azotique produit électriquement dans l'atmosphère et entraîné dans le sol par les pluies est représenté le plus souvent par 1-3 milligrammes par litre d'eau dans nos régions (cette quantité peut atteindre 16 mgr. sous les tropiques) ; cela correspond pour nos climats à environ 1 kilo d'acide nitrique par hectare et par an. L'azote des débris animaux et végétaux se trouve sous forme d'ammoniaque, d'acide nitrique ou de substances organiques, mais il a pour origine la matière vivante qui s'est développée sur le sol considéré et on ne peut le regarder comme un apport, étant bien entendu qu'il s'agit d'une terre à laquelle on ne fournit pas d'engrais. D'autre part il existe des pertes d'ammoniaque et d'acide nitrique pour le sol ; une partie de l'ammoniaque produite dans

la terre se dégage dans l'air et ne retourne que partiellement à la terre qui reçoit, du fait des pluies, environ 2 kilog. d'ammoniaque par hectare et par an ; de leur côté les nitrates sont, beaucoup plus facilement que l'ammoniaque, entraînés par les eaux d'infiltration et sont amenés à la mer par les fleuves.

Même en calculant d'une manière très large les apports azotés de l'extérieur, leur somme est loin d'atteindre la quantité d'azote, environ 50 kilog., consommé par hectare et par an par la végétation ; il faut donc de toute évidence qu'il existe une récupération de l'azote sous une forme différente de celles que nous avons envisagées, et la question se pose à nous de savoir si l'azote de l'air ne serait pas capable d'intervenir dans le cycle de l'azote chez les végétaux ; cette question a été l'objet de nombreuses controverses qui n'ont pas d'ailleurs encore pris complètement fin ; leur histoire est instructive au point de vue de la mise en évidence des causes d'erreur systématiques et d'ordre biologique qu'on rencontre dans l'étude de telles questions.

En 1771, Priestley affirme que certaines plantes supérieures sont capables d'utiliser l'azote libre de l'air. En 1804, de Saussure ne constata, au contraire pour elles aucune absorption d'azote ; en opérant en présence de l'air atmosphérique confiné, il fut amené à conclure que les organes qui continuent à se développer sans qu'il leur soit offert d'azote combiné n'acquièrent d'azote qu'aux dépens de celui que contenaient les autres parties du végétal au moment où ils ont été mis en expérience ; ces résultats furent confirmés par Senebier et Woodhouse.

Mais c'est avec Boussingault que la question se posa d'une manière vraiment précise. Ses premières expériences datent de 1837-38 ; elles se montrèrent favorables à la théorie de l'assimilation de l'azote libre ; des plantes cultivées en terre calcinée, arrosée avec de l'eau distillée, se trouvèrent plus riches en azote que les graines dont elles provenaient ; les gains en azote étaient, par plante, au bout de trois mois, représentés par les nombres suivants :

Blé	3 mgr.
Trèfle	42 —
Pois	53 —

Mais on pouvait expliquer cet excès d'azote dans les récoltes, surtout celles des Légumineuses, soit par l'absorption de l'ammoniaque de l'air, soit par la fixation de l'azote gazeux ; c'est pour décider de cette importante question que Boussingault entreprit une série d'expériences précises (1851-53) en cherchant à se mettre également à l'abri de la cause d'erreur provenant de la présence d'une petite quantité de nitrate dans la terre.

Le sol, dépourvu d'ammoniaque et de subtances organiques azotées, était constitué par du sable desséché au feu ; on y ajoutait des cendres de graines et il était introduit dans des vases en porcelaine vernie ; les cultures avaient lieu dans une atmosphère confinée à laquelle on fournissait chaque jour une certaine quantité de gaz carbonique ; la cloche où s'effectuait le développement (fig. 23) reposait sur un cristallisoir contenant de l'acide sulfurique empêchant l'ammoniaque de l'air de pénétrer dans l'atmosphère in-

terne; les cultures étaient arrosées régulièrement avec de l'eau distillée introduite par un tube de verre qui pénétrait dans la cloche.

On évaluait la quantité d'azote contenue dans une graine, dans le sol, puis dans les plantes développées pendant un temps qui variait de six semaines à cinq mois. Dans une première série d'expériences effectuées avec de l'Avoine et des Haricots il a été constaté une légère perte d'azote et par conséquent on ne pouvait admettre de fixation de l'azote libre; dans une autre série, pour laquelle le mélange de gaz carbonique (7 à 8 p. 100) et d'air a été effectué une fois pour toutes et qui correspondait par conséquent à un développement des plantes en atmosphère entièrement confinée, il n'a pas été davantage constaté de gain en azote pour le Haricot, le Lupin et le Cresson ; c'était donc bien à l'ammoniaque de l'air qu'il fallait, selon Boussingault, rapporter les légers excès d'azote

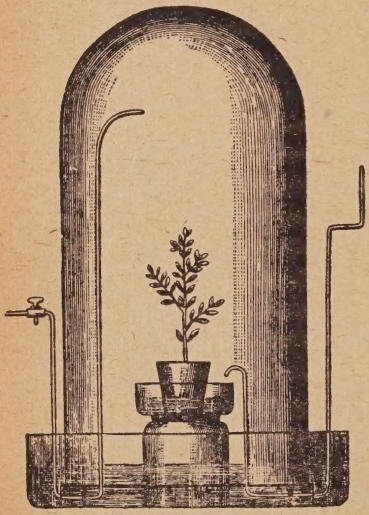


Fig. 23. — Appareil de Boussingault permettant le développement d'une plante sur un sol dépourvu d'azote combiné.

obtenus par lui en 1837. Une nouvelle série d'expériences faites sur seize espèces différentes mit en évidence une perte d'azote dans treize cas ; dans les trois autres cultures il y avait au contraire gain d'azote et remarquons dès maintenant qu'elles se rapportaient à des plantes de la famille des Légumineuses. Les plantes étaient d'ailleurs peu développées et le rapport du poids sec de la récolte à celui des graines était en moyenne égal à 4.

Mais il allait s'établir une controverse entre Boussingault et G. Ville qui, de son côté, obtenait des résultats fort différents ; cette controverse fut d'ailleurs des plus fécondes, car elle amena à préciser certains points qui prêtaient en effet à discussion.

G. Ville obtenait en 1849 une belle végétation dans un sol exempt de composés azotés ; les graines étaient mises à germer dans du sable blanc additionné de cendres de la plante et contenu dans un pot de terre poreuse, reposant à son tour sur de l'eau distillée dont on avait dosé l'ammoniaque ; on évaluait également l'ammoniaque qui existait dans l'air chargé de gaz carbonique qu'on mettait à la disposition des végétaux ; les gains en azote furent considérables, variant de 104 milligrammes à 1 gr. 168 par plante.

Des résultats identiques étaient obtenus en 1851 en débarrassant l'air de son ammoniaque en le faisant passer dans de l'acide sulfurique, puis dans une solution de bicarbonate de soude ; des pieds d'*Helianthus* peuvent se développer dans ces conditions jusqu'à la fleur ; G. Ville obtint de même en 1852 des pieds de Blé produisant des fruits normaux.

Boussingault n'obtenait que des récoltes quatre fois

plus grandes que le poids des graines desséchées ; G. Ville arrivait de son côté à des récoltes représentant deux cent seize fois le poids des graines ; ce dernier auteur pensait pouvoir conclure qu'il s'était, dans ses expériences, rapproché davantage des conditions normales, en particulier par l'emploi de vases en terre poreuse au lieu de porcelaine vernie qui empêchait le renouvellement de l'air au contact des racines.

Boussingault refit en 1854 de nouvelles expériences pour répondre aux objections de G. Ville ; il se servit cette fois de pots en terre poreuse et il évalua l'azote nitrique fourni aux plantes sous forme de cendres ; sur sept cultures effectuées avec le Cresson, la Fève, le Lupin, des Graminées... il n'y eut que dans trois cas seulement, relatifs à des Légumineuses, une petite augmentation d'azote ; il n'y en eut pas pour le Cresson ni pour les Graminées.

Dans une autre série d'expériences, correspondant à une modification du dispositif, on observa, en ce qui concerne la Fève, une augmentation d'azote égale de 5 à 32 p. 100 de l'azote initial ; Boussingault rapporta le fait au temps pluvieux et chaud qu'il fit pendant la durée de la culture et à la formation particulièrement abondante de carbonate d'ammonium.

Enfin, dans une dernière expérience, faite avec des graines très petites, dans un sol absolument dépourvu d'azote, le développement s'est trouvé arrêté au bout de peu de jours. De tout cela Boussingault conclut définitivement que l'*azote libre de l'air n'est pas assimilé par les plantes vertes supérieures.*

Cloëz fit d'ailleurs observer en 1855 que dans les

expériences de G. Ville tout était disposé pour favoriser la production d'acide nitrique : porosité des vases, humidité constante, alcalinité des cendres, absence de substance organique.

G. Ville tenta en 1856 de montrer que les plantes sont incapables au début d'absorber l'azote de l'air et qu'elles ne l'utilisent que lorsqu'elles ont atteint un certain développement, grâce aux nitrates. Mais la thèse de Boussingault prévalut et de nombreux expérimentateurs, Gilbert, Hartig, Bretschneider..., vinrent confirmer ses résultats.

C'est ainsi qu'en 1860 Gilbert et Pugh reprirent au Laboratoire de Rothamsted, en les modifiant de façons variées, les dispositifs de Boussingault et de G. Ville et arrivèrent aux mêmes conclusions que Boussingault, que les expériences aient été effectuées en présence ou en l'absence d'azote combiné fourni sous la forme de sulfate d'ammonium. Nous sommes arrivés à la fin de la première période par laquelle a passé la question.

A la suite de cette première série d'expériences, qui laissaient du reste certains faits sans explications, on a pu établir que les plantes appartenant à la famille des Légumineuses se comportaient d'une manière très particulière en ce qui concerne l'azote de l'air et des recherches précises, que nous rapporterons plus loin, ont montré qu'elles étaient parfaitement capables d'assimiler le gaz en question ; mais on a d'autre part reconnu que ce phénomène ne se produisait que par l'intermédiaire d'un microorganisme symbiotique ; nous verrons, à propos des végétaux inférieurs, en quoi consiste cette remarquable exception présentée par une série de plantes vasculaires. Mais cette

découverte a amené un doute touchant les conclusions de Boussingault et, dans une série de recherches récentes, différents expérimentateurs ont repris la question de l'utilisation de l'azote libre par l'ensemble des plantes supérieures.

Nouvelles recherches sur l'assimilation de l'azote libre par les plantes supérieures autres que les Légumineuses. — Elles se rapportent à deux sortes de travaux, les uns inspirés par une hypothèse de Jamieson, les autres reprenant la question avec la même idée directrice et la même technique que Boussingault.

Théorie et expériences de Jamieson.— L'auteur n'accepte pas les conclusions admises antérieurement et pour lui toutes les plantes supérieures sont capables d'utiliser l'azote libre de l'air, grâce à des organes particuliers qui ne sont autre chose que des poils spéciaux, de nature glanduleuse. Il caractérise l'existence dans ces poils de substances protéiques par la coloration brune en présence de l'iode, par la réaction du biuret et par celle de Millon, et constate qu'au début de leur formation les poils ne présentent pas les réactions des protéines, que celles-ci commencent à apparaître quand les poils sont complètement développés, pour disparaître à nouveau lorsqu'ils sont âgés ; la chose s'explique très facilement pour Jamieson par la formation des protéines par les poils aux dépens de l'azote libre de l'air et leur migration ultérieure vers la tige.

D'autre part Jamieson dit avoir trouvé une augmentation de l'azote total dans diverses cultures de plantes vasculaires (*Azolla, Stellaria media, Lepidium*, Colza)

effectuées en présence ou en l'absence d'azote combiné ; l'auteur conclut que cette augmentation provient de l'azote libre ; mais il n'a pris aucune des précautions reconnues nécessaires par les recherches antérieures relativement aux autres sources d'azote.

Zemplen et Roth (1908) vinrent confirmer l'idée proposée ; ils opérèrent surtout sur les arbres et spécialement des Gymnospermes ; ils constatent que les organes jeunes contiennent plus d'azote que les organes âgés et rapportent ce fait à l'existence et au fonctionnement de poils en massue.

Les objections à cette manière de voir sont évidentes et le développement des protéines dans les poils est plus facilement explicable par des migrations de la plante vers le poil ou inversement que par l'intervention de l'azote libre. Kövessi a d'ailleurs soumis (1912) la théorie de Jamieson à une épreuve expérimentale précise en faisant se développer des plantes dans une atmosphère privée d'azote ; le développement des poils et les diverses réactions des protéines aux différents états de développement s'effectuent absolument de la même manière qu'à l'air libre. L'appareil imaginé par Kövessi est assez compliqué et il est disposé de manière que les réactions en question puissent s'effectuer à l'intérieur même de l'appareil, c'est-à-dire sans faire intervenir l'azote, même quelques instants.

L'oxygène était produit électrolytiquement et l'absence d'azote remplacé par de l'hydrogène était décelée par l'analyse spectrale.

Expériences de Mameli *et* Polacci (1911). — Les

deux auteurs italiens, refusant d'ailleurs de prendre en considération la théorie de JAMIESON, émettent à nouveau des doutes sur les conclusions de BOUSSINGAULT et réalisent une série d'expériences en cultivant des plantes sur des milieux exempts d'azote combiné; MAMELI et POLACCI se sont adressés à des Algues, des graines ou des boutures stérilisées, du moins les auteurs admettent qu'il en est ainsi, à l'aide d'eau oxygénée.

Il a pu être obtenu de la sorte des cultures abondantes d'*Œdogonium*, *de Spirogyra* et de *Zygnema*; des Lichens ont pu se synthétiser dans de telles conditions; en ce qui concerne les plantes supérieures aquatiques, l'*Azolla* a offert un gain en azote égal à 75 p. 100 de l'azote primitif, le *Salvinia* un gain de 66 p. 100 et des *Lemna* un gain de 133 p. 100. Il en a été de même pour différentes Phanérogames terrestres; c'est ainsi que le Radis, dont la graine contient 0 mgr. 53 d'azote, a présenté, en milieu KNOP complet, un gain de 7 mgr. 9, en tenant compte de l'azotate de la solution qui, suivant les auteurs, favorise l'utilisation de l'azote libre; on reconnaît ici l'idée qui avait déjà été émise par G. VILLE.

Mais le dispositif expérimental adopté par les auteurs, leur procédé de stérilisation amènent à penser que leurs expériences n'étaient pas aseptiques; la chose est d'ailleurs certaine pour le cas des Algues qui présentent des bactéries dans leur gaine mucilagineuse.

ŒS a repris la question en 1913 et spécialement en ce qui concerne l'*Azolla*; il cultiva différentes plantes sur des solutions de KNOP avec ou sans azotate; dans

ce dernier cas la plupart des plantes dépérissaient et il en est en particulier ainsi des *Lemna*, contrairement à ce qu'avaient observé Mameli et Polacci ; il s'est cependant produit une exception pour l'*Azolla caroliniana* ; mais dans les expériences d'Œs il y a des bactéries (il n'a pas du reste cherché à les éliminer) et l'*Azolla* présente des cavités à *Anabœna* (Nostocacée) ; c'est à cette Algue symbiotique qu'Œs rapporte l'assimilation de l'azote libre ; les réactions des substances protéiques présentées par les tissus voisins de l'*Anabœna* plaident en faveur de cette manière de voir.

J'ai de mon côté (1916) repris la question de l'utilisation possible de l'azote libre par une des plantes étudiées par Mameli et Polacci, le Radis ; employant la méthode de culture aseptique que j'ai exposée à propos des substances ternaires, j'ai fait se développer cette plante, en l'absence ou en présence de glucose, avec ou sans azote combiné, qui était toujours fourni à l'état de chlorure d'ammonium, en atmosphère renouvelée ou dans des tubes fermés ; enfin dans une série spéciale, les plantes étaient cultivées à l'intérieur de tubes où circulait un courant d'air chargé d'environ 10 p. 100 de gaz carbonique, déterminant une assimilation chlorophyllienne intense.

Dans tous les cas, j'ai établi le bilan de l'azote contenu au début dans le liquide et dans la graine, à la fin dans le liquide et dans la plante ; la différence a toujours été très faible, de l'ordre des erreurs de mesure, tantôt positive, tantôt négative, pratiquement nulle.

Je rapporterai, à titre d'exemple, les résultats fournis

par quatre plantes développées en présence d'une atmosphère riche en gaz carbonique et auxquelles il était fourni une dose variable de chlorure d'ammonium

		I	II	III	IV
Azote initial (mgr.)	Liquide.	0	1,02	1,85	9,30
	Graine .	0,66	0,66	0,66	0,66
		0,66	1,68	2,51	9,96
Azote final (mgr.)	Liquide.	0	0,25	0,11	6,12
	Plante. .	0,59	1,54	2,34	3,72
		0,59	1,79	2,45	9,84
Gain en azote.		— 0,07	+ 0,11	— 0,06	— 0,12

Que les plantes aient à leur disposition ou non de l'azote combiné, que l'assimilation du carbone soit notable ou très réduite, le Radis se montre toujours incapable d'assimiler l'azote libre de l'air ; d'ailleurs l'allure morphologique des plantes en expérience correspondait bien à ces résultats de l'analyse, le développement restant toujours très faible en l'absence d'azote combiné.

En résumé, aucune expérience irréprochable ne vient détruire les conclusions de Boussingault ; du reste on comprendrait mal *à priori* l'assimilation directe de l'azote libre par les végétaux supérieurs ; elle serait en contradiction avec la nécessité reconnue depuis longtemps de recourir en agriculture aux engrais azotés, ainsi qu'avec tous les résultats des analyses volumétriques relatives aux échanges gazeux manifestés par les plantes vertes. Lorsqu'on eut découvert dans l'air un nouveau gaz, l'argon, on a cherché (Schlœsing fils) à reconnaître s'il participait aux échanges vitaux et on n'a pu mettre en évidence que sa nature indifférente.

2. Formation des substances protéiques

Que deviennent les composés ammoniacaux et les nitrates absorbés par les végétaux supérieurs? Il est tout d'abord vraisemblable *à priori* que ces deux sources essentielles d'azote, aboutissant aux mêmes substances complexes, passent à un moment par le même état ; car l'ammoniaque ne s'accumule jamais dans les plantes supérieures, alors qu'on observe fréquemment une accumulation d'acide nitrique ; cela donne déjà à penser que l'ammoniaque doit être utilisée plus vite que l'acide nitrique et que ce dernier doit tout d'abord subir une transformation en ammoniaque ou, en tout cas, une réduction préalable ; plusieurs travaux, dont je dirai quelques mots plus loin amènent en effet à admettre cette manière de voir.

L'étude de la répartition des nitrates dans les végétaux supérieurs montre qu'ils donnent naissance aux substances protéiques et que c'est la feuille qui est l'organe où s'effectue la transformation de l'azote minéral en azote organique ; c'est ainsi que dans la Bourrache les nitrates augmentent en valeur absolue et relative jusqu'au moment de la floraison, passent par un maximum, puis se transforment en protéines ; à la fin de la fructification cette synthèse venant à disparaître les nitrates s'accumulent à nouveau. Au début les nitrates sont importants dans la tige (7,6 p. 100 de substance sèche) alors qu'il n'y en a encore que 0,5 p. 100 dans la feuille ; au commencement de la floraison ils prédominent encore dans la tige, mais sont en quantité plus faible dans la feuille où les matières pro-

téiques deviennent de leur côté seize fois plus considérables.

Comme on constate d'autre part que les nitrates s'accumulent dans les végétaux maintenus à l'obscurité, tandis qu'ils disparaissent à la lumière, ainsi que Pagnoul l'a montré pour les feuilles de Betterave, la réduction des nitrates et l'utilisation de l'ammoniaque correspondant apparaît comme favorisée tout au moins par les radiations solaires. On constate d'autre part que les nitrates sont réduits à la lumière dans les feuilles vertes, alors que le phénomène ne se produit pas dans les feuilles dépourvues de chlorophylle ; le fait est particulièrement frappant pour les feuilles panachées, où les nitrates s'accumulent partout à l'obscurité et ne disparaissent à la lumière que dans les plages vertes.

L'assimilation de l'ammoniaque sous l'action de la lumière a été nettement mise en évidence par les expériences de Muntz ; des feuilles de *Rumex acetosella* ou d'Erable Sycomore ont été placées pendant quelques heures dans une atmosphère ammoniacale ; un lot a été ensuite exposé à la lumière, un autre étant maintenu à l'obscurité ; les quantités d'ammoniaque existant dans 100 grammes de feuilles fraîches étaient les suivantes :

		Rumex	Acer
		mgr.	mgr.
Ammoniaque préexistant dans les feuilles		32	5
Après 16 heures d'exposition dans une atmosphère ammoniacale.	Au sortir de l'atm. amm .	144	41
	8 heures à l'obscurité . .	109	26
	8 — à la lumière . .	92	17

Il y a bien disparition de l'ammoniaque à l'obscurité, mais elle est nettement supérieure à la lumière ;

Muntz a d'ailleurs pris le soin d'établir que l'ammoniaque retrouvée après huit heures d'exposition à l'obscurité ne provenait pas de la décomposition des matières protéiques.

Des recherches analogues ont été entreprises par Laurent à la fois pour l'azote nitrique et l'azote ammoniacal ; des tiges de Pomme de terre sectionnées ont été placées à l'obscurité ou à la lumière, leur base étant introduite dans de l'eau pure, une solution de sulfate d'ammonium ou d'azotate de potassium ; on dosait, au début et au bout de huit jours, l'azote ammoniacal, l'azote nitrique et l'azote organique ; on en trouva, pour 100 grammes de tiges feuillées fraîches, les quantités suivantes (mgr.) :

		OBSCURITÉ			LUMIÈRE		
		Azote ammon.	Azote nitrique	Azote organ.	Azote ammon.	Azote nitrique	Azote organ.
Au début.		13	10	251	30	1,6	262
Au bout de 8 jours	Eau	10	—	251	9	1,8	284
	$SO^4(AzH^4)^2$ . .	36	8	253	68	—	354
	AzO^3K	24	37	251	33	8	349

On voit que la quantité d'azote organique est restée constante à l'obscurité ; il n'y a pas eu de synthèse de substances protéiques. A la lumière au contraire il y a eu, dans tous les cas, une augmentation notable de l'azote organique, mais surtout en présence du sulfate d'ammonium et du nitrate de potassium.

De plus la comparaison des quantités d'azote

ammoniacal au début et à la fin, en présence de la solution de nitrate, montre que l'azote nitrique a été transformé en azote ammoniacal dans la plante, et cela aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. LAURENT expérimenta d'autre part avec des feuilles vertes et des feuilles blanches d'une même espèce (*Acer Negundo*) et constata qu'à la lumière les feuilles vertes assimilent mieux l'azote nitrique que l'azote ammonical et que c'est l'inverse qui se produit pour les feuilles blanches.

Il rechercha enfin quelles sont les radiations actives, en employant la méthode des écrans absorbants ; une solution de bichromate de potassium arrête les radiations qui correspondent à la moitié la plus réfrangible du spectre ; une solution de sulfate de cuivre absorbe au contraire les radiations correspondant à la moitié la moins réfrangible ; enfin une solution de quinine ne se laisse pas traverser par les radiations ultra-violettes. En plaçant des feuilles de Betterave derrière ces solutions servant d'écrans l'auteur constata que leur teneur en acide azotique (rapportée à 1000 de substance sèche) était représentée, avant la même expérience et sept jours après, les nombres ci-dessous :

Avant l'expérience		5,6
Après 7 jours d'exposition derrière les écrans suivants :	Eau	1,4
	Bichromate de potassium	4
	Sulfate de cuivre	1,4
	— de quinine	4

On voit par là que l'acide nitrique a disparu surtout sous l'action des rayons ultra-violets puisque, lorsque ceux-ci sont arrêtés (bichromate de potassium et sul-

fate de quinine), la diminution de l'azote nitrique est très affaiblie ; les radiations actives qui interviennent dans ce phénomène seraient donc très différentes de celles qui agissent dans l'assimilation chlorophyllienne.

Godlewski est arrivé à des conclusions analogues en s'adressant à des plantules de Blé dans lesquelles il a suivi la transformation des nitrates, en dosant l'azote protéique, l'azote organique soluble et l'azote nitrique ; le Blé absorbe et emmagasine l'acide azotique dans toutes les conditions d'éclairement ; mais la transformation en substances protéiques ne se produit qu'à la lumière ; peut-être se forme-t-il tout au plus, d'après Godlewski, des acides aminés à l'obscurité, mais la synthèse ne va pas plus loin.

Le même auteur a montré en outre, qu'il peut se produire des substances protéiques à la lumière, même en l'absence de gaz carbonique, c'est-à-dire sans assimilation du carbone ; aussi Godlewski regarde la formation des substances protéiques et celle des sucres comme tout à fait indépendantes, comme le montrait la nature différente des radiations intervenant dans les deux phénomènes.

Nous verrons ailleurs que la réduction des nitrates à la lumière se traduit par un dégagement supplémentaire d'oxygène qui se trouve accroître le quotient $\frac{O^2}{CO^2}$ de l'assimilation chlorophyllienne et lui donne des valeurs sensiblement plus grandes que l'unité. On peut montrer d'autre part que les nitrates peuvent être réduits à l'obscurité chez les plantes vertes, comme ils peuvent l'être pour les plantes dépourvues de chlo-

rophylle. C'est ce qui a lieu par exemple pour les graines (Laurent) ; si on vient à introduire des graines, stérilisées au bichlorure de mercure et germées sur de l'eau distillée stérile, dans une solution de nitrate de potassium à 1 p. 100, le liquide donne au bout de quarante-huit heures la réaction des nitrites, alors qu'on n'observe rien de semblable avec des graines au repos. Cette formation de nitrite est d'autant plus grande que l'aération est plus faible ; on n'obtient rien si on assure un large contact avec l'air ; dans le vide au contraire la réduction est rapide ; elle est donc liée à la vie anaérobie. Le même phénomène se produit pour des tiges de Pomme de terre, des bulbes, des fruits, des Algues et des Champignons.

En résumé nous sommes amenés à penser, en ce qui concerne les plantes vertes, que l'acide nitrique est réduit, à l'obscurité comme à la lumière, mais plus abondamment à la lumière et qu'il donne naissance à de l'ammoniaque. Quelle est maintenant la série des transformations qui font passer l'ammoniaque à l'état de substances protéiques et qui nécessitent l'intervention de la lumière ? Il faut avouer qu'ici nous sommes surtout en présence d'hypothèses ; mais la présence des produits aminés et amidés résultant de la transformation des matières protéiques a conduit à penser que le travail de construction des protéines amène la même série de corps que celle qui correspond à leur destruction, mais naturellement en sens inverse. On fait donc jouer aux acides aminés, et en particulier à l'asparagine, le rôle capital dans l'élaboration des protéines à partir de l'ammoniaque ; le fait signalé précédemment de la nutrition azotée possible des plantes

vertes à partir de l'azote aminé ou amidé est d'ailleurs un argument important en faveur de cette manière de voir ; il en existe un autre qui consiste dans la formation d'asparagine dans de jeunes plantules privées de leurs cotylédons et par suite de leurs réserves azotées, lorsqu'on vient à mettre à leur disposition du nitrate de potassium et un sel ammoniacal.

Les expériences réalisées en vue de mettre en évidence la formation des acides aminés à partir d'azote ammoniacal ou nitrique sont assez contradictoires ; c'est ainsi que Laurent a été amené à conclure qu'il ne se produisait pas de substances organiques azotées à partir des sels ammoniacaux. Mais Prianichnikov, répétant ces expériences, a montré qu'il était essentiel de tenir compte de la toxicité physiologique des sels ammoniacaux ; en fait, en opérant sur le Pois, en présence de solutions diluées (0,075 à 0,1 p. 100) de chlorure d'ammonium, il a obtenu des résultats de l'ordre suivant :

	Azote total	Azote protéique	Azote d'asparagine	Azote ammoniacal
	—	—	—	—
Eau distillée	4,56 p. 100	2,23	0,59	0,015
Chlorure d'ammonium .	4,37 —	2,53	0,47	0,013

On ne constate donc pas d'accroissement de la quantité d'asparagine en présence de chlorure d'ammonium ; elle est même légèrement inférieure à celle qui se trouve réalisée dans les plantes développées sur l'eau distillée ; mais si on répète ces expériences en neutralisant la solution par du carbonate de calcium, au fur et à mesure de la production d'acide chlorhydrique libre, les résultats sont tout différents et

deviennent de l'ordre de ceux qui sont rapportés ci-dessous :

	Azote total	Azote protéique	Azote d'asparagine	Azote ammoniacal
	—	—	—	—
Eau distillée	4,28 p. 100	2,53	0,689	0,027
Chlorure d'ammonium + carbonate de calcium.	4,75 —	2,65	1,333	0,028

La teneur en ammoniaque dans les plantules reste constante malgré l'absorption continue de cette substance à partir de la solution nutritive et c'est surtout l'asparagine qui se trouve augmenter dans de fortes proportions. Si on compare la quantité d'ammoniaque qui a disparu de la solution et celle qui se trouve sous forme d'asparagine on obtient des nombres très sensiblement égaux.

Avec les graines de *Cucurbita Pepo* on obtient des résultats analogues ; rapportés à 100 plantes ils se traduisent par les nombres suivants :

	Eau distillée	Chlorure d'ammonium	Chlorure d'ammonium + carbonate de calcium
	—	—	—
Azote total	1 gr. 438	1 gr. 545	1 gr. 746
— protéique. .	1 — 153	1 — 050	0 — 987
— d'asparagine.	0 — 194	0 — 379	0 — 495
— ammoniacal.	0 — 009	0 — 006	0 — 005

L'azote amidé a encore augmenté considérablement dans le troisième lot, mais il était déjà sensiblement accru dans le second ; pour la plante considérée l'acidité physiologique déterminée par le chlorure d'ammonium se trouve être moins active que pour le Pois ; avec le Maïs, enfin, les lots II et III se trouvent donner des résultats sensiblement égaux, la sensibilité de la

plante à l'acidité se trouvant être encore plus faible que pour la Courge.

Inversement, il existe des plantes, telles que le Lupin, pour lesquelles l'emploi des sels ammoniacaux à acide fort provoque des troubles profonds dans l'assimilation de l'ammoniaque, troubles auxquels on ne peut parer par l'addition de carbonate de calcium; Prianichnikov, qui a mis ces faits en évidence, les explique par la composition chimique différente des graines envisagées. Si le Lupin se comporte d'une manière spéciale vis-à-vis des sels ammoniacaux, la cause en est dans la faible teneur de ses graines en sucres; en effet le Lupin présente les mêmes phénomènes que le Pois et le Maïs si on augmente la quantité des sucres soit par une assimilation chlorophyllienne à la lumière, soit par une nutrition artificielle en glucose. Développées à la lumière les plantules de Lupin jaune forment en effet les quantités suivantes d'asparagine à partir de chlorure d'ammonium (quantités rapportées à 100 plantes) :

	Azote total	Azote ammoniacal	Azote d'asparagine
Eau distillée.	0 gr. 876	0 gr. 023	0 gr. 151
Chlorure d'ammonium.	0 — 901	0 — 027	0 — 234
Chlorure d'ammonium + carbonate de calcium.	0 — 980	0 — 024	0 — 252

Les phénomènes deviennent identiques à ceux qui ont lieu pour l'Orge à l'obscurité. C'est d'ailleurs bien à la formation des sucres qu'il faut rapporter le phénomène et non à l'action directe de la lumière; car si on répète les expériences à la lumière, mais en l'absence

de gaz carbonique, les résultats deviennent les suivants :

	Azote ammoniacal	Azote d'asparagine
	—	—
Eau distillée.	0 gr. 124	0 gr. 237
Chlorure d'ammonium. .	0 — 125	0 — 231

Il n'y avait plus formation d'asparagine ; les plantes se comportaient comme des plantes étiolées.

D'autre part des cultures aseptiques de Lupin (*L. angustifolius*), en présence de chlorure d'ammonium et de glucose et à l'obscurité, conduisent à la même conclusion, ainsi que le montrent les résultats qui suivent, rapportés à 100 plantes :

		Azote total	Azote protéique	Azote ammoniacal	Azote d'asparagine
		—	—	—	—
		gr.	gr.	gr.	gr.
Chlorure d'ammonium.	0 glucose	1,003	0,217	0,123	0,490
	2 p. 100 glucose .	1,249	0,380	0,082	0,619

La nutrition glucosée a diminué la quantité d'ammoniaque libre et augmenté d'une manière très sensible la production de l'asparagine à partir de l'ammoniaque absorbée.

Inversement on peut amener les graines riches en sucre à se comporter vis-à-vis de l'ammoniaque à la manière du Lupin ; il suffit pour cela de réduire leurs réserves hydrocarbonées, en les soumettant à une inanition. Les plantules d'Orge mises à germer sur de l'eau distillée ou sur une solution à base de chlorure d'ammonium se sont comportées au bout de onze jours comme d'ordinaire, mais au bout de vingt et un jours on voit

apparaître les phénomènes qui caractérisent le Lupin :

		Azote total	Azote protéique	Azote ammoniacal	Azote d'asparagine
11 jours.	Eau distillée . .	0,164	0,101	0,005	0,016
	$AzH^4Cl + SO^4Ca$.	0,191	0,097	0,008	0,034
21 jours.	Eau distillée . .	0,165	0,074	0,008	0,037
	$AzH^4Cl + SO^4Ca$.	0,200	0,077	0,051	0,027

Il y a au bout de vingt et un jours accumulation d'ammoniaque et diminution d'asparagine. L'asparagine nous apparaît donc comme l'un des intermédiaires les plus importants entre la source d'azote fournie à la plante et les substances protéiques ; nous verrons d'ailleurs plus loin qu'on doit la considérer comme une substance de formation secondaire par rapport aux acides aminés, dont il dérive par des phénomènes d'oxydation aboutissant à la formation d'ammoniaque et à l'amidation consécutive des acides proprement dits.

On a successivement proposé différentes réactions pour expliquer le passage de l'ammoniaque aux acides aminés. On a tout d'abord, ne considérant que les plantes vertes, fait intervenir dans cette synthèse le phénomène chlorophyllien ; et c'est ainsi que Lœw admet que les acides aminés se formeraient par la réaction de l'ammoniaque sur l'aldéhyde formique suivant la réaction :

$$AzH^3 + H.COH = H.COAzH^2$$

aboutissant à la formation de formiamide.

Bach, partant de l'acide azotique admet que ce corps serait réduit en acide nitreux AzO^2H, puis en

acide hyponitreux AzOH et aboutirait au radical AzH qui, en présence de l'eau, donnerait de l'hydroxylamine

$$AzH + H^2O = AzH^2.OH$$

puis il y aurait réaction de cette hydroxylamine avec l'aldéhyde formique et formation de formiamide, premier terme de la synthèse d'un corps amidé :

$$AzH^2.OH + H.COH = H.COAzH^2 + H^2O$$

Signalons encore ici une autre hypothèse (A. Gautier, Treub) qui admet, à la base de la formation des plantules protéiques, celle de l'acide cyanhydrique par réaction des nitrates sur l'aldéhyde formique

$$2\,AzO^3H + 5\,H.COH = 5\,CAzH + 3\,CO^2 + 5\,H^2O$$

Nous reviendrons sur cette hypothèse lorsque nous envisagerons dans quelles conditions l'acide cyanhydrique existe dans les végétaux.

Ces diverses explications ont le tort de n'être applicables qu'aux végétaux chlorophylliens qui ne possèdent pas l'apanage de produire des acides aminés à partir de l'ammoniaque ; les conditions que nous avons exposées précédemment d'après les travaux de Prianichnikov et qui président à la formation des acides aminés donnent à penser que les sucres interviennent dans ce phénomène et il est bien vraisemblable qu'il se produit de la même manière chez tous les êtres vivants. Les travaux de Knoop et Embden ont démontré que l'organisme animal est capable d'effectuer la synthèse des acides aminés si on met à sa disposition d'une manière simultanée de l'ammoniaque

et des acides organiques α cétoniques de structure R.CO.COOH ; d'après ce que nous avons vu se produire dans les végétaux, de tels acides dériveraient des sucres et l'ammoniaque, réagissant sur eux, les transformerait en acides aminés ; il y a lieu à ce propos de remarquer que le lévulose, que nous avons été amenés à considérer comme jouant surtout un rôle plastique, est précisément un sucre α cétonique.

Cette intervention des sucres dans la formation des acides aminés, que nous avons mise en évidence en ce qui concerne la nutrition ammoniacale, s'applique également au cas où on part des nitrates comme source azotée ; c'est ainsi que Zaleski, opérant sur des feuilles détachées d'*Helianthus*, puis abandonnées à l'obscurité sur une solution nutritive contenant du nitrate de potassium et du sucre, a montré qu'il s'y produit une augmentation du taux des substances protéiques ; l'enrichissement en matières protéiques par mètre carré est donné par le tableau suivant, la teneur étant au début de l'ordre de 2 gr. 6 :

Durée (jours)	AzO^3K sucre	0 AzO^3K sucre	AzO^3K 0 sucre
6	+ 0 gr. 232	— 0 gr. 004	»
18	+ 0 gr. 194	+ 0 gr. 006	»
21	»	»	— 0 gr. 245

Il n'y a formation de substances protéiques qu'en présence simultanée de nitrate et de sucre et ce résultat amène à considérer que la lumière n'intervient que d'une manière indirecte dans la formation des substances protéiques, par la production de sucre.

Des expériences analogues ont été réalisées par Suzuki sur des plantules de Blé germées depuis sept jours,

hautes de 15 centimètres environ et placées pendant une semaine sur une solution de nitrate de sodium à 0,2 p. 100; ces plantules ont été ensuite divisées en deux lots dont l'un a été analysé et l'autre placé à l'obcurité sur une solution de sucre à 10 p. 100; au bout de sept jours les plantules du deuxième groupe ont présenté une notable augmentation de l'azote protéique (30,5 au lieu de 25,2) en même temps que l'acide nitrique a complètement disparu ; ce fait ne se reproduit plus d'ailleurs avec des solutions sucrées beaucoup moins concentrées, à 1 p. 100 par exemple.

Ce qui ressort le plus nettement des observations et expériences précédentes, c'est que chez les plantes supérieures c'est la feuille qui apparaît comme l'organe essentiel de synthèse des matières protéiques et que la lumière intervient ; si nous ne pouvons attribuer au pigment chlorophyllien un rôle direct dans cette synthèse, du moins nous constatons qu'il existe un parallélisme étroit entre la présence et l'absence de chlorophylle dans un organe donné et la nature des substances azotées qui s'y trouvent contenues.

C'est ainsi que les Phanérogames parasites ou saprophytes dépourvues de chlorophylle (Cuscute, *Neottia, Monotropa*...) contiennent toujours beaucoup de nitrates et que le taux en substances organiques azotées solubles par rapport aux protéines est très élevé ; il en est de même des feuilles panachées, comparées aux feuilles vertes du même individu ou de la même espèce, des feuilles florales normalement dépourvues de chlorophylle, des fruits également pauvres en pigments verts, des feuilles automnales

chez lesquelles la chlorophylle se décompose, ou encore de galles où se passe un phénomène analogue ; les nombres suivants donneront une idée de ces différences ; ils représentent la quantité d'azote soluble rapportée à 100 d'azote total :

Acer Negundo.	Feuilles vertes normales	19
	— blanches	52
Arum maculatum.	— vertes	19
	Spathes	41
Fagus silvatica.	Feuilles	9
	Cupules	22
Phaseolus vulgaris.	Feuilles	19
	Gousses	52
Fagus silvatica (feuilles).	Fin de septembre	9
	1er novembre (vert jaune)	24
	3 — (jaunes)	31
Ulmus campestris.	Feuilles	19
	Galle de *Tetraneura Ulmi*	50

Mais dans tous ces cas il n'est pas établi si on est en présence d'azote soluble ne se synthétisant pas en substances protéiques, ou d'azote soluble provenant de la destruction des substances protéiques existant antérieurement, de leur digestion.

La formation des substances protéiques est d'autre part influencée par un certain nombre de conditions, au premier rang desquelles il convient de citer la présence d'oxygène ; c'est ainsi que Zaleski et Kovchoff ont montré que dans des tubercules sectionnés il ne se produit pas de substances protéiques en l'absence d'oxygène ; de même certaines substances, telles que les anesthésiques, peuvent empêcher cette formation ; d'après les recherches de Zaleski les plantules de Lupin dont on a détaché les cotylédons peuvent, à l'obscurité, effectuer la synthèse des protéines en pré-

sence de sucre et de substances azotées, mais cette synthèse n'a plus lieu sous l'action des vapeurs d'éther.

On a cherché dans un certain nombre de travaux à considérer spécialement les conditions de formation des nucléoprotéides ; elles apparaissent surtout dans les organes en voie de croissance et peuvent se comporter d'une manière indépendante des protéines simples.

Si on place des plantules de Blé à l'obscurité, on constate que la quantité des nucléoprotéides augmente d'une manière très sensible alors que celle des protéines simples diminue notablement. La formation des nucléoprotéides paraît dépendre, dans les feuilles, de la présence de sucre et de la lumière ; Palladine a pu montrer que leur taux augmente dans les feuilles étiolées de Fève en présence de saccharose, et dans de plus fortes proportions à la lumière qu'à l'obscurité, ainsi que le montrent les nombres ci-dessous :

	6 jours sur saccharose	
Début	Obscurité	Lumière
—	—	—
18,6	82,6	166,4

Distribution des différentes matières azotées dans les plantes supérieures. — Les substances protéiques fabriquées surtout dans la feuille et, plus généralement, les substances azotées qui sont liées à leur formation ou à leur décomposition se répartissent dans toute la plante et d'une manière assez inégale. Dans la feuille on a trouvé des quantités de protéines variant de 3 p. 100 de la matière sèche (Pissenlit) à 33 p. 100 (Epinard), le taux étant souvent au voisinage de

15 p. 100. De là elles émigrent après transformation dans toute la plante et viennent en particulier s'accumuler dans les organes qui constituent des réserves destinées à être utilisées ultérieurement, comme c'est le cas pour la graine et pour les organes souterrains (tubercules, rhizômes, bulbes...).

Si on dose les différentes formes d'azote au cours du développement des graines, on constate que les protéines augmentent d'une manière constante en même temps que diminuent les substances azotées plus simples ; nous reproduisons, à titre d'exemple, les nombres ci-dessous, qui se rapportent aux quantités des différentes formes d'azote pour 100 grammes de graines de Fève en voie de formation et desséchées :

	Azote total	= Azote protéique	+ Azote soluble	Azote aminé	Azote amidé
	—	—	—	—	—
28 juillet. . .	6,65	3,51	3,14	0,84	0,89
18 août . . .	8,77	7,63	1,14	0,34	0,49

Dans les graines mûres on constate un taux de protéines relativement faible dans les graines à albumen cellulosique (4,4 p. 100 chez le Dattier) ; il atteint en moyenne 13 p. 100 dans les farines de Céréales et il peut s'élever jusqu'à 53 p. 100 (*Robinia pseudacacia*) ; mais les conclusions que nous venons de tirer de la diminution des matières organiques azotées solubles et de l'augmentation des substances protéiques lors de la maturation de la graine prêtent à une sérieuse objection provenant de ce qu'il existe constamment des échanges entre cette graine et la plante qui la nourrit ; ce pourrait être la proportion différente des deux sortes de matériaux arrivant à la

graine que nous trouverions mettre ainsi en évidence. Pour arriver à une certitude à cet égard, il est nécessaire d'opérer des dosages successifs sur des graines détachées de la plante ; c'est ce qu'a réalisé Pfenniger pour des graines de Pois, prélevées dans les gousses et placées dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau ; on dose au début et au bout de cinq jours les différentes formes d'azote ; les résultats obtenus, rapportés à 100 d'azote total, sont portés ci-dessous :

	Témoins	5 jours
Azote protéique	79	89,2
— amidé	9,1	5
— précipité par l'acide phosphomolybdique .	10,1	4,8
Autres formes d'azote	1,8	1

Il y a donc bien formation de substances protéiques aux dépens des acides amidés et des bases azotées, puisque la quantité totale d'azote reste constante.

Wassilieff est arrivé à des conclusions identiques en opérant sur le Lupin blanc.

	Témoins	5 jours
Azote protéique	69,9	83,5
— amidé	12,3	2,8
— précipité par l'acide phosphomolybdique .	11,1	7,2
Autres formes d'azote	6,7	6,5

On observe des faits tout à fait semblables pour les organes souterrains de réserve ; au cours de leur formation on constate la même accumulation de protéines et de substances azotées relativement simples, telles que les acides aminés, mais la proportion de

ces dernières diminue par rapport à l'azote total au cours de la maturation. Les grains d'aleurone sont beaucoup plus rares dans les organes de réserve souterrains que dans les graines et le fait est en rapport avec la teneur plus élevée en eau de ces organes ; on a observé cependant des cristalloïdes isolés dans le phelloderme de la Pomme de terre ainsi que dans les bulbes de *Narcissus poeticus*.

Le taux des organes souterrains en protéines est en moyenne sensiblement moins élevé que pour les graines ; on trouve par exemple les nombres suivants représentant la quantité de protéines rapportée à 100 de substance sèche :

Tubercules de Manioc .	0,64	Betterave	5,5
Pomme de terre	2,6	Radis	18,8
Crosne du Japon. . . .	5,3	Oignon	19,1

Il n'est d'ailleurs pas d'organe d'une plante supérieure qui ne soit susceptible de contenir des protéines de réserve, qu'il s'agisse de la tige, des bourgeons, du fruit ou du pollen. C'est ainsi que le pollen du Noisetier contient jusqu'à 30 de protéines pour 100 de matière sèche, en même temps que de l'hypoxanthine, de la guanine, de la xanthine. Les fruits en présentent des quantités très variables, souvent faibles :

Poire	1,94	Figue.	5,75
Cerise.	3,45	Aubergine	19,83

CHAPITRE III

NUTRITION AZOTÉE DES VÉGÉTAUX HÉTÉROTROPHES

1. Azote combiné

Les plantes dépourvues de chlorophylle peuvent utiliser l'azote à partir de l'ammoniaque et de l'acide nitrique ; mais elles se nourrissent aussi d'un grand nombre de substances organiques azotées ; c'est le cas des Bactéries et des Champignons ; c'est d'ailleurs aussi celui des plantes supérieures dont la vie parasitaire a entraîné la disparition de la chlorophylle et qui empruntent l'azote à leurs hôtes sous une forme complexe.

En ce qui concerne les microorganismes on peut dire qu'à chaque espèce correspondent des substances azotées nutritives qui lui sont particulièrement favorables, et que d'autre part il n'est guère de substance organique azotée qui ne soit susceptible d'être utilisée par quelque microorganisme ; aussi, pour traiter de la nutrition azotée des plantes hétérotrophes, saprophytes ou parasites, faudrait-il considérer chaque espèce en particulier et donner la liste des matières

azotées qu'elle est capable d'utiliser ; nous aurions à dresser ainsi de longues listes, qui d'ailleurs sont loin d'être établies pour tous les végétaux et qui n'auraient pas, d'autre part, un très grand intérêt.

Pour ne citer qu'un exemple disons que le *Sterigmatocystis nigra* est capable d'utiliser l'azote des sels ammoniacaux, des nitrates, mais aussi des acides aminés (leucine, asparagine...), des amides (acétamide, urée, biuret...), et de nombreuses autres substances telles que la guanidine, l'allantoïne, l'acide urique, la caféine, la nicotine, la méthylhydrazine, le ferricyanure de potassium, etc...

Les résultats obtenus pour les divers organismes ont permis de tenter une classification (Beijerinck, 1890 ; Fischer, 1903) basée sur la nature de l'aliment azoté le plus favorable et on a distingué de la sorte les groupes suivants :

Organismes utilisant surtout l'ammoniaque. — Ce sont par exemple le *Sterigmatocystis nigra*, l'*Eurotiopsis Gayoni*, les Levures, le *Bacillus subtilis*.

Le fait a été sutout bien mis en évidence pour le *Sterigmatocystis nigra* ; des liquides synthétiques, semblables à celui qui a été établi par Raulin, donnent les meilleurs rendements, pour une même quantité de saccharose constituant la source de carbone, avec le tartrate d'ammonium ; si on remplace ce corps par de l'azotate d'ammonium, de manière à fournir la même quantité d'azote pour le même poids de carbone, on constate le fait intéressant qu'en présence des deux sources d'azote, azote ammoniacal et azote nitrique, le Champignon utilise en premier lieu, ou

tout au moins plus rapidement, l'azote ammoniacal ; le liquide de la culture devient acide au cours des premiers stades de développement par suite de la mise en liberté d'acide azotique ; le Champignon opère une véritable élection physiologique. Ce n'est que lorsque toute l'ammoniaque a été consommée que l'acide azotique en excès disparaît à son tour, s'il reste encore à ce moment du sucre inemployé ; si au contraire tout le sucre a disparu l'acide azotique reste sans modification.

C'est cette séparation de l'acide azotique à partir de l'azotate d'ammonium que Tanret a réalisée d'une manière un peu différente en faisant une première culture de *Sterigmatocystis nigra* sur un milieu contenant 0 gr. 5 de nitrate d'ammonium ; au bout de vingt-quatre heures de développement du Champignon, le liquide était soutiré et remplacé par un liquide semblable au précédent en ce qui concerne les autres substances, mais dans lequel on élevait à 0 g. 75 la dose de nitrate d'ammonium ; on recommençait ainsi l'opération un certain nombre de fois en surnitratant successivement le liquide ; on constate dans ces conditions qu'il se produit un mycélium blanc, ne sporulant pas et ne fabriquant pas, comme cela a lieu dans les conditions normales, d'acide oxalique. On obtient les mêmes phénomènes avec le chlorure ou le sulfate d'ammonium ; dans le cas particulier de la première substance il s'accumule intégralement tout l'acide chlorhydrique correspondant à l'ammoniaque utilisée, cet acide ne pénétrant pas dans le mycélium. Nous sommes en présence d'un phénomène semblable à celui qui nous a déjà occupé

quand nous avons cherché à nous rendre compte de la valeur alimentaire comparée des sels ammoniacaux et des nitrates pour les plantes supérieures.

Organismes utilisant surtout les nitrates. — Ce sont le *Mucor racemosus*, l'*Alternaria tenuis*, l'*Aspergillus glaucus*, le *Monilia candida*, le *Bacillus pyocyaneus*, le *Bacillus fluorescens*, etc...

Organismes utilisant surtout les nitrites. — Dans cette catégorie viennent se ranger le *Rhizopus Oryzæ*, les *Ustilago*, le *Bacillus typhi*.

Organismes utilisant surtout les peptones et les protéoses. — Il s'agit des *Cladosporium*, *Basidiobolus*, *Saprolegnia*, du *Proteus vulgaris*, du *Bacillus anthracis*...

Organismes utilisant surtout les protéines. — Ce sont surtout des végétaux parasites tels que l'*Isaria densa*, les *Entomophthora*, le *Bacillus diphteriæ*, le *Micrococcus gonorrheæ*, etc...

Certaines substances organiques azotées peuvent servir à la fois de sources de carbone et d'azote ; c'est le cas des acides aminés pour les Levures, de l'ovalbumine pour l'*Isaria densa*, et dans ce dernier cas il est inutile d'introduire dans le milieu de culture aucune substance minérale, les besoins du Champignon étant satisfaits à ce point de vue par l'albumine même.

Cette spécialisation plus ou moins étroite des microorganismes vis-à-vis de la source azotée explique la

distribution floristique des Champignons et des Bactéries et se trouve en rapport étroit avec la biologie de ces végétaux.

Ajoutons enfin que la nature de la meilleure source d'azote peut varier pour un même être avec celle de la matière hydrocarbonée qui se trouve à sa disposition ; c'est ainsi qu'en présence de glucose, le *Monilia sitophila* assimile le mieux les peptones ; avec le saccharose ce sont les acides aminés, tels que l'asparagine, qui conviennent le mieux. De la même façon le *Bacillus coli* et le *Bacillus subtilis* assimilent l'acide nitrique en présence de glucose ; ce mode de nutrition n'a plus lieu avec la glycérine.

2. Assimilation de l'azote libre

A. Microorganismes des Légumineuses

A la suite des expériences de Boussingault sur le rôle négatif de l'azote libre vis-à-vis des végétaux supérieurs, certains faits restaient sans explication et nous avons déjà fait allusion à celui qui concerne les plantes de la famille des Légumineuses. De tout temps les agriculteurs avaient remarqué que la culture de ces végétaux (Luzerne, Trèfle, Sainfoin...) constituait pour le sol un véritable amendement ; le Blé, semé après elles, se développait beaucoup mieux, même lorsqu'on ne procédait pas à une fumure artificielle ; et cependant les plantes avaient été fauchées plusieurs fois et le foin qui en résultait se trouvait avoir enlevé une notable quantité d'azote.

Boussingault a donné des nombres relatifs à l'excé-

dent de l'azote des récoltes sur l'azote des fumures dans la série d'assolements suivants :

	Azote (kg.) par hectare		
	Récolte	Fumure	Excédent
Assolement de 3 ans (Blé, jachère, Blé).	87	83	+ 4
Assolement de 4 ans (Pomme de terre, Blé, Trèfle, Blé).	338	182	+ 156
Culture continue de Luzerne pendant 5 ans.	1 035	0	+ 1 035

La différence est toujours positive en faveur des récoltes et on ne tient pas compte de l'azote qui a été entraîné par les eaux à l'état combiné ou qui disparaît par dénitrification ; on ne tient pas compte, il est vrai, de l'ammoniaque et de l'acide azotique apportés à la terre par les pluies ; mais cette quantité ne peut expliquer les excédents signalés et particulièrement celui qui concerne la culture continue de Luzerne, sans addition d'engrais.

Boussingault avait d'ailleurs remarqué, dans les expériences que nous avons rapportées précédemment, et qui étaient relatives à la fixation possible de l'azote libre par les plantes supérieures, que, lorsqu'il se produisait une légère augmentation d'azote, elle se rapportait toujours à des cultures de Légumineuses. G. Ville avait tort d'admettre une assimilation de l'azote libre de l'air par toutes les plantes supérieures, Boussingault avait tort de son côté de ne l'admettre pour aucune.

Une série d'expériences ne tardèrent pas à préciser que les Légumineuses se comportent très différem-

ment des autres plantes vasculaires vis-à-vis des engrais azotés ; si, répétant par exemple l'expérience de WAGNER, nous cultivons parallèlement des Pois et de l'Avoine dans les trois sols suivants : 1° sable sans engrais ; 2° sable avec sel de potassium et phosphate ; 3° sable avec sel de potassium, phosphate et azotate ; nous constatons (fig. 24 et 24 *bis*) que l'Avoine ne se développe bien que dans le troisième lot ; le Pois au contraire se développe aussi bien dans le deuxième lot que dans le troisième ; il n'est donc pas nécessaire de fournir à cette dernière plante, comme on doit le faire pour l'Avoine, de l'azote combiné et on est amené à voir dans

Fig. 24. — Cultures d'Avoine sur des milieux sans engrais (O), avec potassium et phosphore (KP), ou avec potassium, phosphore et azote combiné (KPN).

l'azote combiné ou libre de l'air un aliment pour les Légumineuses.

Mais par quel mécanisme s'effectue cette fixation?

On l'a d'abord expliquée par le développement relativement grand du feuillage qui absorberait ainsi des

Fig. 24 *bis*. — Cultures de Pois sur des milieux sans engrais (O), avec potassium et phosphore (KP), ou avec potassium, phosphore et azote combiné (KPN).

quantités relativement considérables d'azote combiné de l'air ; mais c'est en 1886-88 qu'Hellriegel, puis Hellriegel et Wilfarth mirent en évidence la

manière dont les Légumineuses intervenaient vis-à-vis de l'azote libre.

Les auteurs établirent successivement les faits suivants :

Les Légumineuses, comme l'expérience que nous venons de rapporter l'a montré, ne se développent pas toujours proportionnellement à la quantité de composés azotés assimilables qui sont mis à leur disposition, comme c'est le cas pour les autres plantes.

Les Légumineuses sont capables de se développer sans azote combiné si la terre n'est pas stérilisée ; quelquefois cependant un certain nombre de plantes d'une culture restent rabougries au milieu des autres qui offrent un développement normal.

Les Légumineuses sont par contre incapables de se développer dans un sol dépourvu d'azote combiné et qui a été stérilisé au préalable.

Si cette même terre stérilisée est additionnée d'une petite quantité de délayure d'un sol où ont été cultivées des Légumineuses, le développement devient intense et bien homogène ; la récolte en matière sèche et en azote est considérable.

L'expérience précédente ne donne plus aucun résultat avec une délayure de terre de Légumineuses portée au préalable à 70°.

Ces expériences ont été effectuées dans des vases de 40 centimètres de haut, de 15 centimètres de diamètre, contenant 8 kilos de sable additionné de phosphate de potassium, de sulfate de magnésium et de chlorure de calcium ; si on les ensemence

avec du Lupin, on obtient les rendements suivants en azote :

		gr.
Sol non stérilisé.	Addition de terre de Lupin non stérilisée	+ 1,1
	— — — stérilisée	— 0,008
Sol stérilisé à 100°	Addition de terre de Lupin non stérilisée	+ 0,975
	— — — stérilisée	— 0,012
	Pas d'addition de terre de Lupin.	— 0,080

Avec des plantes autres que des Légumineuses telles que le Chou, l'Avoine, le Chanvre on n'obtenait rien de semblable.

Parallèlement à ces faits, relatifs à l'intensité du développement des plantes envisagées, Hellriegel et Wilfarth ont constaté que dans une terre normale les racines des Légumineuses présentaient des renflements très particuliers résultant de la transformation de certaines radicelles et appelés *tubercules radicaux* (fig. 25) ; ils sont d'autant plus nombreux qu'il existe dans le sol moins d'azote combiné. Ils n'apparaissent qu'à une certaine phase du développement de la plante ; celle-ci, lorsqu'elle a épuisé les réserves contenues dans les cotylédons, jaunit et paraît souffrir ; elle passe par une période critique qui a été dénommée *faim d'azote* ; si la plante continue à dépérir on constate qu'elle est dépourvue de tubercules radicaux ; lorsqu'au contraire ceux-ci font leur apparition la végétation reprend son allure normale ; la période de croissance définitive est donc toujours précédée par l'apparition des tubercules.

Ces tubercules ne se rencontrent pas sur les racines des Légumineuses mises à germer dans une terre stéri-

lisée ; ils ne s'observent au contraire qu'après l'addition à ce substratum de délayure de terre de Légumineuse ; si par hasard un pied reste chétif au milieu des autres, on constate qu'il s'agit précisément d'une plante sur les racines de laquelle les nodosités font défaut.

Il existe donc pour les Légumineuses un rapport étroit entre leur développement, leur rendement en azote et l'existence sur leurs racines de nodosités spéciales. Ce rapport a été expliqué par la mise en évidence de la nature biologique des tubercules radicaux, qui correspondent à une symbiose entre la plante et un microorganisme qu'on a appellé le *Rhizobium radicicola* Beyer. ou *Rh. Leguminosarum*.

Les radicelles hypertrophiées qui constituent les nodosités sont courtes, d'abord blanchâtres, puis rosées, surtout vers le centre ; elles varient un peu de forme avec les diverses Légumineuses ; c'est ainsi que chez le Pois elles sont ordinairement ovoïdes, isolées ou fusionnées par 2 à 4 (fig. 25, E) ; chez le Lupin elles sont plus volumineuses et ordinairement sphériques (fig. 25, A). Leur structure est essentiellement différente de celle des racines normales ; elles sont polystéliques (fig. 25, C) et tout leur parenchyme central a ses cellules remplies de nombreux individus du microorganisme symbiotique.

Le *Rhizobium* a été étudié par Woronine, Prillieux, etc.., et cultivé par Beijerinck ; les cellules qui le constituent ont quelques μ de long et 1 μ de diamètre transversal ; elles ont l'aspect de bâtonnets simples ou bifurqués en V ou en Y (fig. 25, C) ; on les a appelées quelquefois des bactéroïdes et il semble bien que l'organisme en question est voisin des Myxobactéries.

Les éléments sécrètent une matière mucilagineuse

Fig. 25. — A, nodosité de Lupin; C, bactéroïdes des nodosités; D, nodosités de Fève; E, nodosités de Pois; B, coupe transversale d'une nodosité de Fève.

formant des sortes de cordons qu'on a pris quelquefois pour des filaments mycéliens.

Le *Rhizobium* se cultive aisément, par exemple dans du bouillon de Haricot auquel on ajoute du saccharose, un peu de chlorure de sodium, puis du carbonate de sodium en quantité suffisante pour opérer la neutralisation. On peut employer pour réaliser cette culture, la technique suivante. On stérilise une nodosité en la traitant pendant vingt minutes par une solution de sublimé à 1 p. 1000, puis on la lave à trois reprises dans de l'eau distillée stérilisée ; on broye ensuite la nodosité à l'aide d'un agitateur flambé, en présence d'un peu d'eau, et, à l'aide d'une pipette stérilisée, on prélève quelques gouttes de la pulpe obtenue et on les porte sur le milieu nutritif que nous venons d'indiquer ; dans ces conditions on obtient surtout la forme bacillaire, mais l'organisme est très polymorphe et l'aspect sur lequel il se présente est essentiellement variable avec la composition du milieu nutritif et l'âge des cultures.

Le microorganisme s'inocule aisément aux Légumineuses à partir des cultures, comme à partir des tubercules eux-mêmes. Une certaine spécificité paraît d'ailleurs exister entre les organismes qui se développent sur les différentes espèces de Légumineuses ; le Pois s'inocule avec des cultures faites à partir de nodosités de la Fève, de la Gesse, du Trèfle, mais plus difficilement avec le *Rhizobium* provenant du Lupin ; le Soja ne présente de tubercules qu'en présence de terre du Japon, son pays d'origine ; le Robinier n'est pas infecté par les organismes du Pois ou du Lupin, mais l'est par ceux du Cytise.

Lorsqu'on procède aux inoculations par arrosage du sol on constate que les nodosités ne se constituent que dans les parties supérieures du sol (1/3 environ des racines) ; cela tient à ce que les bactéries contenues dans le liquide sont retenues par les particules terreuses.

Démonstration directe de l'assimilation de l'azote libre par les Légumineuses. — Certains doutes subsistaient cependant après les travaux d'Hellriegel et Wilfarth, surtout en ce qui concerne l'origine de l'azote qui n'était attribuée à l'azote libre de l'air que par élimination ; ces doutes furent levés par les expériences de Schloesing fils et Laurent en 1892. Des Pois étaient cultivés sur du sable calciné, placé dans une allonge qui communiquait par sa partie supérieure avec des appareils à absorption. L'enceinte étant parfaitement close on y faisait le vide et on y introduisait des volumes connus d'azote, d'oxygène et de gaz carbonique ; on y faisait arriver de temps à autre du gaz carbonique et on supprimait l'excès d'oxygène en faisant passer l'atmosphère sur du cuivre porté au rouge.

Les Pois, stérilisés, étaient arrosés avec le contenu de quelques tubercules radicaux ; après la culture on faisait le vide à nouveau et on évaluait l'azote restant ; la différence avec l'azote introduit et l'azote restant correspondait à la quantité d'azote assimilé par les Pois. Cette méthode d'évaluation de l'azote assimilé a été appelée par les auteurs la *méthode directe* ; par une seconde méthode, dite *indirecte*, on évaluait l'azote emprunté par les plantes au milieu extérieur en fai-

sant la différence entre l'azote total contenu dans le sol à la fin de l'expérience et dans la plante développée d'une part, et celui qui existait au début dans le sol et dans la graine d'autre part ; les nombres obtenus par ces deux méthodes sont les suivants :

Méthode directe.

Azote introduit.	2 681 cm³ 2	
— restant	2 652 — 14	
— disparu	29 cm³ 06 ou 36 mgr. 1	

Méthode indirecte.

Azote au début.	Sol.	4 mgr. 3	32 mgr. 6
	Graine	28 — 3	
Azote à la fin .	Sol.	15 — 1	73 — 1
	Plante	58 — 0	
	Excédent. .		40 mgr. 5

La concordance est des plus satisfaisantes et c'est bien l'azote libre de l'air qu'on retrouve dans la plante ; on voit d'ailleurs que le sol lui aussi s'est enrichi en azote combiné au cours de la culture.

Il n'y avait pas trace de fixation de l'azote libre si on ne procédait pas à l'inoculation par le *Rhizobium* et, incidemment, les auteurs ont montré que les plantes n'appartenant pas à la famille des Légumineuses n'absorbaient pas l'azote gazeux ; c'était, pour ces végétaux, une nouvelle confirmation des conclusions de Boussingault.

L'analyse des tubercules radicaux montre d'ailleurs qu'il y a emmagasinement d'azote à leur intérieur ; c'est ainsi qu'on trouve pour le Pois, considéré au moment de la floraison, les quantités suivantes d'azote,

correspondant à des substances protéiques ou à des acides aminés tels que l'asparagine :

Racines sans nodosités. .	1,6 d'azote p. 100 de matière sèche	
Racines avec nodosités. .	5,2	— —

On a trouvé dans les tubercules de la Lentille jusqu'à 7,5 p. 100 d'azote, ce qui correspond à la quantité énorme de 47 p. 100 de matières protéiques, alors qu'il n'en existe que 5 p. 100 dans les racines saines.

Voici d'ailleurs les résultats d'analyses faites par Bréal en ce qui concerne la teneur en azote pour 100 de matière sèche des nodosités de diverses Légumineuses, comparée à celle des racines normales.

	Tubercules	Racines
	—	—
Robinier	3,25	2,30
Lupin	3,30	0,80
Haricot. Avant la floraison .	3,80	—
Haricot. Après la floraison .	4,60	2,90
Lentille.	7	1,80

Dans les conditions naturelles d'infestation le *Rhizobium* pénètre par les poils absorbants de la racine, dans lesquels on reconnaît des *cordons muqueux*, correspondant à des colonies du microorganisme. La formation des nodosités sur les racines des Légumineuses est liée d'autre part à diverses conditions réalisées par le sol. C'est ainsi qu'elle est favorisée par une faible teneur en azote combiné, en nitrates particulièrement ; si la plante a à sa disposition une telle source d'azote, elle se défend contre l'attaque du parasite qu'est le *Rhizobium* ; inversement

l'humus, la chaux et le phosphore favorisent le développement des tubercules radicaux.

Il existe enfin des degrés dans la virulence de la bactérie et on a pu signaler l'existence de races physiologiques dans la création desquelles la nature du sol intervient.

Les recherches de Beijerinck ont montré que les microorganismes isolés des nodosités des différentes espèces de Légumineuses présentaient également des différences sensibles au point de vue morphologique, par exemple dans leurs dimensions et dans leur forme ; il s'agit de variétés voisines, appartenant à une même espèce et correspondant à des adaptations à des hôtes différents. Ces différentes variétés sont d'autre part plus ou moins sensibles à l'acidité du sol, à sa teneur en calcaire ; en ce qui concerne la première condition, B. Fred et A. Davenport ont montré que les limites de l'acidité sont exprimées pour différentes variétés de *Rhizobium* par les valeurs suivantes de P_H :

Luzerne, Trèfle	4,9
Pois, Vesce	4,7
Fève	4,2
Lupin	3,15

Les recherches de M. Prucha (1915) et de Wilson sur les organismes symbiotiques des tubercules radicaux du Pois du Canada et du Soja ont précisé l'influence de certaines conditions sur la formation de ces nodosités ; elles se produisent en plus grand nombre à l'obscurité qu'à la lumière et les différentes substances nutritives agissent de façons variées ; c'est ainsi qu'en ce qui concerne le Soja les nodosités se

trouvent favorisées par les phosphates, le calcium, de nombreux chlorures et plusieurs substances organiques, telles que les sucres, les acides oxalique, lactique et nitrique, la caféine ; elles diminuent au contraire en nombre ou cessent complètement de se former sous l'action des nitrates et des sels ammoniacaux ; les auteurs ont montré de plus que la formation des tubercules radicaux est favorisée par une grande teneur en eau du sol ; leur nombre va régulièrement en croissant quand cette teneur prend des valeurs comprises entre 25 et 75 p. 100.

Mais, s'il est établi que c'est à la symbiose du *Rhizobium* et des racines de Légumineuses qu'est due l'assimilation de l'azote libre de l'air, quelle part revient dans le phénomène à chacun des constituants ?

L'étude des cultures pures de la bactérie conduisit tout d'abord à la conclusion qu'à l'état isolé le *Rhizobium* n'est capable que d'absorber de très petites quantités d'azote (Beijerinck, Franck, Berthelot). Mazé (1897), à la lumière des expériences de Winogradsky et de Kossowitch sur d'autres organismes, a montré qu'il s'agit ici d'une question de milieu de culture. Si on donne au *Rhizobium* une quantité suffisante de sucre, il utilise des quantités appréciables d'azote gazeux ; c'est ainsi qu'une culture a donné comme teneur en azote, au début et à la fin :

	Sucre	Azote
Au début	3 gr. 5	70 mgr.
A la fin	0 — 5	118 —
Différences.	— 3 gr.	+ 48 mgr.

c'est-à-dire qu'il y a eu environ 1 gramme d'azote fixé

pour 60 grammes de sucre consommé, et, d'une manière générale, la quantité d'azote libre utilisé s'est montrée proportionnelle à la quantité de sucre disparu.

On comprend alors ce qui se passe dans le cas de la symbiose qui s'établit entre les Légumineuses et le *Rhizobium*; celui-ci prend à la plante une partie de son sucre et, au début, de son azote combiné ; puis, à partir de l'énergie libérée par la destruction du sucre, il réalise la synthèse des substances azotées à partir de l'azote libre.

Cette symbiose peut d'ailleurs se transformer en un véritable parasitisme pour la Légumineuse ; c'est ce qui arrive lorsque le microorganisme se développe trop abondamment et soustrait par suite trop de sucre à la plante ; il n'est pas rare de voir par exemple des Pois souffrir et même périr du fait de la formation d'un trop grand nombre de nodosités ; ce phénomène se produit en particulier à la suite d'infections tardives, au mois de juillet, et surtout dans les sols riches en humus.

Ainsi se trouve définitivement expliquée la qualité de plantes améliorantes reconnue de tout temps aux Légumineuses, dont la culture équivaut pour le sol à une fumure azotée.

On connaît du reste des productions analogues aux nodosités qui viennent de nous occuper chez des plantes appartenant à des familles très différentes ; c'est le cas des racines d'Aulne dont les radicelles se transforment aussi en tubercules ordinairement associés en assez grand nombre et dus à la pénétration du *Frankia Alni* (fig. 26). Des formations semblables

sont connues sur les racines de diverses Eléagnées, telles que l'*Hippophae rhamnoides*, les *Eleagnus*, et sur celles de *Podocarpus*.

Nobbe a conclu de ses recherches (1904) que le *Frankia*

Fig. 26. — Nodosités provoquées sur les racines d'Aulne par le *Frankia Alni*.

Alni est capable, tout comme le *Rhizobium radicicola*, d'assimiler l'azote libre ; il en est peut-être de même

des mycorhizes, sans que la chose soit démontrée expérimentalement; c'est le rôle que leur assigne Frank d'une manière hypothétique; ces symbioses radiculaires fungiques expliqueraient ainsi à la fois la reprise de l'azote de l'humus des forêts qui ne nitrifie pour ainsi dire pas et l'enrichissement de ces forêts en azote aux dépens de l'air; mais nous allons revenir sur ce dernier point.

Nitragine. — Aussitôt acquise la notion de la fixation de l'azote libre par le *Rhizobium*, on a cherché à tirer parti de ses propriétés en agriculture. On a d'abord cherché à obtenir de bonnes récoltes de Légumineuses par ensemencement des bactéries symbiotiques dans des sols pauvres, et on a effectué cet ensemencement par addition de terre de Légumineuses; mais la nature chimique de cette terre ajoutée est apparue comme jouant le rôle principal.

Puis on a cherché à remplacer la terre de Légumineuses, dont le transport est coûteux (il en fallait au moins une tonne à l'hectare), par des cultures artificielles (nitragine). Hobbe et Hiltner ont cultivé, en les mélangeant, les bactéries de différentes espèces de Légumineuses sur un milieu gélosé qu'il suffisait de délayer dans l'eau; on aspergeait les graines et on arrosait la terre; les résultats obtenus furent incertains et, malgré les perfectionnements qu'on a cherché à introduire et de nombreux essais effectués en Allemagne, en Amérique et en Suède, l'efficacité du procédé est restée fort douteuse.

B. Fixation de l'azote libre par les bactéries du sol

En ce qui concerne la nutrition azotée des végétaux, il est d'autres faits que celui qui a trait aux Légumineuses qui restent sans explication. Si nous considérons par exemple le sol d'une forêt, nous constatons qu'il s'enrichit continuellement en azote, malgré les coupes effectuées et malgré l'absence de Légumineuses ; on a pu évaluer à 50 kilos la quantité d'azote qu'une forêt de Hêtres accumule par an à l'hectare ; c'est une quantité qui est sans rapport avec les poids d'ammoniaque et d'acide nitrique apportés par les pluies.

Une expérience d'Henry (1897) montre en petit cette fixation d'azote dans les forêts ; des feuilles de Chêne, entassées à l'air dans une caisse dont le fond est recouvert de calcaire, ont donné les quantités suivantes d'azote total au début et à la fin de l'expérience, rapportées à 100 de matière sèche :

Au début.	1,108	Azote fixé.	0,815
A la fin	1,923		

De même dans les montagnes les prairies peuvent présenter jusqu'à 9 grammes d'azote par kilo de terre, sans qu'on leur en restitue, et malgré l'azote enlevé sous forme de viande et de lait ; c'est encore un phénomène semblable qui s'observe pour les terres en jachère et dans lesquelles on constate une accumulation d'azote combiné. Est-ce l'azote libre de l'air qui est encore fixé dans ces diverses conditions et par quel mécanisme ?

Berthelot (1885) observa que de la terre pauvre en azote combiné, mise dans un vase placé lui-même dans une chambre close, où on était par conséquent à l'abri de l'azote combiné apporté par les pluies ou par les poussières, présentait les quantités d'azote suivantes par kilo :

Au début.		71 mgr.
Au bout de	5 mois	93 —
	17 mois	118 —

Il y avait donc eu, au bout de dix-sept mois un gain de 47 milligrammes, ce qui correspond à 66 p. 100 de la valeur initiale ; 1/5 à peine de cette augmentation correspondait à de l'azote nitrique.

Si d'autre part on répétait l'expérience en vase clos et après avoir porté la terre à 100° on n'observait plus de fixation d'azote ; celle-ci s'effectuait donc par l'intermédiaire de microorganismes. Restait à déterminer la nature de ces êtres fixateurs d'azote libre.

Bactéries anaérobies. — C'est Winogradsky qui y réussit (1893) ; il ensemença avec des traces de terre le liquide suivant qui ne comprenait pas trace de substance azotée :

Eau.	1 000 cm³
PO^4K^2H	1 gr.
$SO^4Mg + 7H^2O$	0 — 5
NaCl.	0 — 01
$SO^4Fe + 7H^2O$.	0 — 01
Glucose	30 —

et qui était neutralisé à l'aide de carbonate de calcium ; dans ce milieu qui ne contenait que les traces d'azote entraînées par le semis de la terre, il se déve-

loppait plusieurs espèces de bactéries et, après avoir

Fig. 27. — *Clostridium pastorianum;* cultures : jeune (en haut) et âgée (en bas) avec spores.

effectué un certain nombre de reports, on ne se trou-

vait plus qu'en présence de trois organismes ; l'un, le *Clostridium pastorianum* (fig. 27), est anaérobie et on peut l'isoler par des cultures dans le vide ; il se comporte d'une manière très analogue aux ferments butyriques ; les deux autres, qui sont aérobies, sont un bacille très fin qu'on a désigné par la lettre α et un bacille β, épais au contraire.

L'ensemble de ces trois bactéries produit une fermentation butyrique qui consomme le glucose et on peut constater la fixation de l'azote libre. Ensemencé à l'état de pureté sur le milieu sucré primitif le *Clostridium* ne produit pas de fermentation bien nette ; si au contraire on reconstitue l'association avec les bactéries α et β la fermentation s'établit d'une manière très régulière ; ces organismes paraissent intervenir en protégeant le *Clostridium* contre l'oxygène de l'air ; on peut du reste les remplacer par tout autre organisme (*Aspergillus*, *Penicillum*...), d'où l'explication du rôle joué au début par de très petites quantités d'azote combiné existant dans le liquide et qu'on a reconnues comme nécessaires ; elles déterminent le développement de ces organismes non fixateurs d'azote libre et amorcent ainsi la réaction.

On peut encore se dispenser de ces organismes accessoires et les remplacer par une atmosphère dépourvue d'oxygène, constituée par exemple par de l'azote pur ; on se trouve donc en présence d'une association bactérienne, une sorte de symbiose, où le rôle essentiel revient d'ailleurs au *Clostridium*.

Il se forme dans ces cultures de l'acide butyrique et de l'acide acétique, et on peut reconnaître que pour 1 gramme de glucose consommé, il y a environ 1,3-

1,8 d'azote libre fixé. Voici d'ailleurs la manière dont WINOGRADSKY établit le bilan de la fermentation d'une solution glucosée par le *Clostridium pastorianum* ; pour 1 litre de solution à 4 p. 100 de glucose la culture étant effectuée dans un courant d'azote, on a les résultats ci-dessous :

	Au début	A la fin
Sucre	40 gr.	0
Azote	0 mgr.	53 mgr. 6
Acide butyrique	0 —	14 — 16
— acétique	0 —	3 — 71
Acides gras	0 —	44 — 7
Alcools supérieurs	0 cm³	0 cm³ 33
Acide lactique	0	traces

Le *Clostridium pastorianum* a été isolé par WINOGRADSKY à partir de différents sols, et l'auteur pense que la fixation de l'azote libre n'est pas une propriété très répandue parmi les microorganismes et qu'elle n'existe que pour des espèces assez spéciales. BEIJERINCK admet au contraire qu'il existe dans le sol un assez grand nombre d'espèces bactériennes assimilant l'azote libre et il les divise en oligo-, macro-, et polynitrophiles, suivant leur aptitude plus ou moins grande à remplir cette fonction. En fait, différents auteurs sont parvenus à isoler un certain nombre de bactéries capables d'utiliser l'azote atmosphérique ; plusieurs espèces de *Clostridium* ont été décrites, provenant du sol ou des eaux de la mer. PRINGSHEIM (1906) a signalé un *Clostridium* (*C. americanum*) qui assimile bien l'azote gazeux en flacons ouverts, sans le concours de bactéries ou de Champignons aérobies ; il donne naissance à de l'aldéhyde formique et à des acides acétique, butyrique et lactique.

Bredemann (1908) a montré que beaucoup de bactéries se rattachant au genre *Amylobacter* et au type *mobilis non liquefaciens*, dont on a fait le genre *Granulobacter*, sont susceptibles de fixer l'azote libre ; ce sont les *Gr. butylicus*, *Gr. pectinivorum*, ainsi que le *Bacillus sacchobutyricus* et le *Bacillus asterosporus* ; il s'agit toujours d'ailleurs de microorganismes déterminant une fermentation butyrique et vraisemblablement ils ne constituent que des variétés du *B. amylobacter*.

Dans les conditions naturelles, dans le sol, les bactéries anaérobies fixatrices d'azote doivent emprunter leur énergie à des substances carbonées et celles-ci semblent leur être surtout fournies par une sorte de symbiose qui s'établit avec des organismes autotrophes tels que les Algues vertes ; le fait a été surtout bien mis en évidence pour des bactéries que nous allons envisager.

Bactéries aérobies. — On connaît toute une série d'autres microorganismes constituée par des bactéries aérobies, capables d'utiliser l'azote libre de l'air ; le type en est l'*Azotobacter chroococcum* et l'*Az. agile* de Beijerinck ; le premier s'obtient facilement en ensemençant de la terre de jardin sur le liquide gélosé suivant :

Eau	1 000
Mannite	20
PO^4KH^2	0,2

On obtient au bout de vingt-quatre heures à 30° des colonies d'*Azotobacter chroococcum* (fig. 28) qui apparaissent sous la forme d'un diplocoque de 3 à 5 μ

de diamètre ; il attaque un grand nombre de sucres et fixe environ 9 milligrammes d'azote par gramme de sucre consommé. La mannite est transformée en alcool, acide lactique et acide acétique ; il se dégage du gaz carbonique et un peu d'hydrogène ; mais la

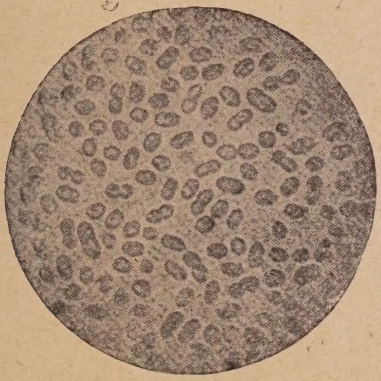


Fig. 28. — *Azotobacter chroococcum.*

production d'acides et d'alcool paraît devoir être rapportée à d'autres bactéries que l'*Azotobacter* même.

On connaît actuellement quatre groupes différents de ces *Azotobacter* ; ce sont les suivants :

1° Groupe de l'*A. chroococcum*, caractérisé par la production de pigments allant du brun au noir ;

2° Groupe de l'*A. Beijerincki* à pigment jaune soufre ;

3° Groupe de l'*A. agile* constitué par des espèces fluorescentes, très mobiles ;

4° Groupe de l'*A. vitreum* correspondant à des élé-

ments immobiles, présentant un aspect macroscopique vitreux.

On a signalé de ces bactéries dans tous les sols, exception faite des sols très acides ; on en a également isolé de l'eau de mer où ils se trouvent associés à différentes Algues (*Fucus*, Laminaire).

Ces microbes utilisent un grand nombre de substances ternaires, alcools polyatomiques, sucres réducteurs, bioses, amidon, pentosanes, composés pectiques, cellulose ; le taux d'azote fixé est variable avec ces diverses substances ; on a également observé une assimilation de l'azote fort variable sous l'action de l'*A. chrococcum* suivant les matières végétales complexes qui se trouvent décomposées ; le tableau suivant (Dvorak) donne une idée de ces variations de la quantité d'azote assimilé (mg) pour 100 grammes de carbone :

	Azote fixé
Paille de Blé	28 mgr.
Aiguilles de Pin	57 — 3
Feuilles d'Erable	89 — 5
— de Chêne	126 — 9
Lupin	711 — 5
Trèfle vert	1 237 — 9
Glucose	1 456 — 5

Il y a lieu de remarquer que la fixation d'azote est souvent plus considérable dans les cultures impures ; c'est ainsi que les *Azotobacter* déterminent une utilisation relativement grande de l'azote atmosphérique lorsqu'ils sont associés, en présence de cellulose, à des ferments de cette substance tels que le *Bacillus radiobacter* ; de même on obtient une importante fixation de l'azote par une association du *Clostridium*

et d'un *Azotobacter* ; ces deux bactéries constituent une véritable symbiose étudiées par Omeliansky et dans laquelle l'*Azotobacter* protège en particulier le *Clostridium* contre l'oxygène de l'air.

Parmi les substances nécessaires au bon développement des *Azotobacter*, on a reconnu le rôle important du calcium, surtout sous la forme de carbonate ; Christensen a montré que la répartition des *Azotobacter* dans le sol est liée d'une manière très étroite avec la basicité du sol et surtout avec sa teneur en calcaire ; ces bactéries ne paraissent pas supporter une acidité supérieure à celle qui correspond à la valeur 6 de P_H. Il en résulte que la présence ou l'absence d'*Azotobacter* dans un sol peut nous renseigner sur la teneur en chaux de ce dernier et on a fondé une méthode rapide de diagnostic relativement au besoin des terres en chaux ; elle consiste essentiellement à remplacer dans la solution nutritive de Beijerinck la chaux par 5 grammes de la terre à étudier ; s'il n'y a pas de développement d'*Azotobacter* c'est que la terre en question a besoin d'une addition de chaux.

Rémy et Rösing (1911) ont attiré l'attention sur le fait que les *Azotobacter* ne se développent bien en présence de mannite que si on ajoute un extrait de terre ; ils ont montré que l'humus agissait ainsi en raison du fer qu'il contient.

Les résultats obtenus avec les cultures en milieux liquides ne renseignent pas d'ailleurs exactement sur ce qui se passe dans le sol sous l'influence des *Azotobacter* ; c'est ainsi que Krainski a montré que l'azote fixé dans le sol représente $\frac{1}{20-30}$ du sucre utilisé

alors que la proportion n'est que de $\frac{1}{100-200}$ pour les milieux liquides.

L'humus ne contenant pas de substance carbonée saccharifiable, il est probable que les *Azotobacter* trouvent dans le sol les substances nécessaires à leur développement et à la production d'énergie correspondant à la fixation d'azote dans les débris végétaux non encore humifiés ; il est d'autre part possible qu'ils entrent en symbiose avec les Algues vertes du sol.

Les diverses espèces de microbes aérobies fixateurs d'azote semblent exister dans le sol jusqu'à une profondeur de 50 à 80 centimètres ; elles font partie d'une flore très complexe, elles profitent des décompositions produites par d'autres organismes et leur fonctionnement dépend d'une série de conditions dont l'une, l'aération, a fait l'objet de recherches expérimentales ; Koch a montré que la terre arable, prélevée à des profondeurs variables, s'enrichit toujours plus en azote lorsqu'on a le soin de la remuer que lorsqu'elle est tassée ; dans une expérience la teneur en azote était ainsi de 0,074 p. 100 dans le second cas, alors qu'elle atteignait la valeur de 0,109 p. 100 pour le même sol aéré ; nous sommes en présence d'une des causes qui expliquent les bienfaits du labour.

Alinite. — On a songé à appliquer les résultats obtenus dans les recherches que nous venons de relater à la pratique agricole, comme nous avons dit qu'on l'avait tenté pour le *Rhizobium radicicola*.

Caron avait observé qu'un microbe isolé d'une

luzernière possédait la propriété de rendre plus assimilable la matière azotée du sol ; il s'agit du *Bacillus Ellenbachensis* qui n'est peut-être d'ailleurs pas autre chose que le *B. megatherium* ; Stoklasa lui attribua en outre la faculté de fixer l'azote libre ; des cultures de ce microbe mélangées à de la fécule de pomme de terre ont été désignées sous le nom d'alinite et ont été employées à la façon d'un engrais ; les résultats furent d'ailleurs négatifs.

On n'obtint non plus aucun résultat satisfaisant avec des ensemencements d'*Azotobacter* et de *Clostridium* ; il est très vraisemblable que nous ne pouvons pas, par de telles pratiques, modifier l'équilibre du sol, déterminé par la flore naturelle et qui dépend elle-même des conditions physiques et chimiques ; il est raisonnable de penser que là où une espèce microbienne fait défaut c'est qu'elle ne peut se développer et non pas que ses germes sont absents ; on doit agir davantage sur le sol par des modifications physico-chimiques, amenées par des pratiques de l'ordre du drainage, du marnage, des labours...

C. Fixation de l'azote libre par les Mucédinées et les Algues

Y a-t-il d'autres microorganismes que les Bactéries qui soient capables de fixer l'azote libre de l'air ? Berthelot (1893), puis Puriewitsch admirent cette propriété pour les Mucédinées, en particulier pour le *Sterigmatocystis nigra* ; la fixation apparaissait d'ailleurs très faible ; elle correspondait, suivant Puriewitsch, pour cette dernière Mucédinée, aux quantités suivantes d'azote,

correspondant à diverses teneurs en sucre du milieu :

Sucre p. 100	Az fixé
5	2 mgr. 2
10	4 — 7
20	6 — 5

Différents auteurs ont cru pouvoir reconnaître la même propriété à des *Mucor*, *Alternaria*, *Hormodendron*, *Cladosporium*, ainsi qu'à des Levures (*Saccharomyces cerevisiæ*, *S. apiculatus*) et à des *Torula* ; plus récemment cette fonction est apparue comme douteuse et la question réclame de nouvelles recherches.

En 1889 Frank attira d'autre part l'attention sur la fixation possible de l'azote gazeux par les Algues qui végètent à la surface du sol ; abandonnant du sable dans de grands ballons exposés à l'air libre et recouverts simplement d'un couvercle de verre pour empêcher la pluie de pénétrer, cet auteur constata, au bout de cent trente-quatre jours, un accroissement de l'azote contenu dans ce substratum qui avait donné lieu à un développement de diverses Algues, soit en surface, soit entre la paroi du verre et le sable ; il s'agissait d'Oscillariées, d'*Ulothrix*, de *Pleurococcus* ainsi que de prothalles de Mousses. Pour résoudre la question de savoir si les plantes en question étaient les agents de la fixation d'azote il en ensemençait du sable stérilisé et dosait l'azote total avant et dix-huit semaines après le semis ; il obtenait les résultats rapportés ci-dessous :

			Az p. 100
Sol avant l'expérience.			0,0045
A la fin de l'expérience.	Sol non ensemencé (lumière).		0,0037
	Sol ensemencé.	Obscurité .	0,0027
		Lumière . .	0,0082

Le sol est donc par lui-même incapable de fixer l'azote atmosphérique, mais il peut réaliser cette fixation à la lumière grâce au développement des Algues.

Ces expériences ont été reprises par Schlœsing fils et Laurent qui montrèrent qu'on peut arrêter la fixation de l'azote par l'action d'un antiseptique ; les auteurs établirent d'autre part un bilan exact de l'azote dans des expériences conduites comme celles qui étaient relatives à l'azote fixé par le *Rhizobium* ; l'azote fixé était évalué à la fois par la méthode directe et la méthode indirecte que nous avons antérieurement définies.

On introduisait dans des allonges 600 grammes de terre arable à laquelle on ajoutait 2 grammes correspondant à plusieurs échantillons de terres riches de jardin et 100 centimètres cubes d'une solution de sulfate de potassium, sulfate de calcium et sulfate de fer. On obtenait ainsi le développement, à la surface de la terre, d'une couche verte formée surtout par deux Algues bleues, le *Nostoc punctiforme* et le *N. minutus,* auxquelles s'ajoutaient diverses espèces de bactéries.

Les résultats ont été les suivants :

Méthode directe.

Azote au début	982 cm³ 9	
— à la fin	931 — 2	
— disparu	51 cm³ 7 ou 65 mgr.	

Méthode indirecte.

Azote initial				73 mgr. 5
Azote final	En surface (couche de 3 mm.)	78,3	136 — 1	
	En profondeur	57,8		
	Gain			62 mgr. 6

La concordance est parfaite entre l'azote fixé par la terre et celui qui a disparu dans l'air.

Mais la question se posait alors de savoir quel était dans cette fixation d'azote libre le rôle qui revenait aux Algues et aux Bactéries ; pour effectuer ce départ il était de toute nécessité de reprendre les expériences soit avec les Algues pures, soit avec les Bactéries qui les accompagnent. Kossowitch (1894) isola un certain nombre d'Algues vertes du sol, telles que le *Chlorella vulgaris*, le *Cystococcus humicola*, le *Stichococcus bacillaris*, et montra que leurs cultures pures n'assimilent pas l'azote libre de l'air ; le milieu nutritif qui lui a servi à isoler les Algues vertes en question était constitué par du sable imbibé de la solution qui suit :

Eau	1 000 cm³
PO^4K^2H	0 gr. 25
$SO^4Mg + 7H^2O$	0 — 37
NaCl	0 — 20
SO^4Ca	traces
$(PO^4)^2Fe^3$	traces.

à laquelle on ajoutait du sucre et dans certains cas un nitrate ; il fut facile de constater qu'il n'y avait jamais développement d'Algues en l'absence de cette dernière substance ; dans les expériences de Frank et dans celles de Schlœsing et Laurent les bactéries devaient donc intervenir.

Si on étudie ces bactéries isolément, on voit qu'elles fixent, en cultures artificielles, une quantité d'azote proportionnelle à la quantité de sucre consommé et il devient alors très probable que, dans les conditions naturelles, les Algues ont comme rôle de fournir du sucre aux bactéries, soit de leur vivant,

soit après leur mort ; c'est encore une symbiose qui se produit ici.

Kossowitch a montré que la quantité de sucre mise à la disposition des cultures intervient également pour des cultures mixtes d'Algues et de Bactéries ; cet auteur a trouvé les quantités respectives suivantes d'azote fixé par des cultures effectuées en l'absence ou en présence de sucre :

	Pas de sucre	Sucre
Nostoc + bactéries . .	8,8	25,4
Cystococcus + — . .	3,1	8,1
Stichococcus + — . .	2,3	2,7

Bouilhac a montré l'existence de pareilles symbioses fixatrices d'azote libre pour le *Nostoc punctiforme*, l'*Ulothrix*, le *Schizothrix* ; ces organismes ne se développent pas à l'état pur sans nitrates, mais elles le font très normalement lorsqu'elles sont associées à des bactéries.

L'azote ainsi fixé peut être ensuite utilisé par les plantes supérieures, ainsi que le montrent les résultats obtenus par Bouilhac avec le Sarrasin cultivé sur du sable de Fontainebleau ; si on ajoute à ce sable uniquement des bactéries le rendement est à peu près nul ; si on ensemence avec le *Nostoc* accompagné des mêmes bactéries le sol s'enrichit en azote et le Sarrasin présente un développement appréciable ; c'est ainsi que dans une expérience l'azote de la récolte est représenté par les nombres suivants :

	Azote de la récolte
Sarrasin seul	29 mgr. 24
Avec Algues et Bactéries	127 — 27

De nombreuses autres recherches, en particulier celles de KRÜGER et SCHNEIDEWIND, celles de CHARPENTIER, ont porté sur diverses autres espèces d'Algues unicellulaires se développant à la surface du sol et montrèrent qu'aucune n'est capable de se développer en l'absence de nitrate ou d'une autre source appropriée d'azote combiné ; la nature chlorophyllienne de ces Algues implique qu'elles ne sont susceptibles d'exister qu'à la surface du sol, tout au plus à quelques millimètres de profondeur, puisque la lumière est nécessaire à leur évolution ; à ce fait correspond une accumulation d'azote très importante dans la couche superficielle du sol, où les bactéries utilisent les hydrates de carbone élaborés par les Algues.

Depuis les recherches que nous venons de rappeler la question a été reprise de savoir si les Algues vertes ne seraient pas capables, en l'absence de bactéries, d'utiliser l'azote libre de l'atmosphère ; c'est ainsi que WANN (1914) est arrivé à conclure à l'existence de ce phénomène ; mais les expériences de cet auteur ont été reprises tout récemment par BRISTOL et PAGE (1923) avec des cultures pures de *Chlorella*, de *Pleurococcus*, de *Cystococcus* et de *Scenedesmus*, en présence de nitrate d'ammonium, de sulfate d'ammonium ou de nitrate de calcium, avec ou sans glucose ; dans aucun cas les auteurs n'ont pu vérifier les conclusions avancées par WANN ; les différences qui se manifestent entre les résultats obtenus doivent être attribuées à l'emploi de certaines méthodes d'analyse de l'azote, en particulier de l'azote nitrique, qui seraient sujettes à des erreurs.

Il existe donc en résumé dans le sol divers microorganismes capables de fixer directement l'azote gazeux de l'air ; ce sont :

1° Le *Rhizobium radicicola* vivant en symbiose avec les racines des Légumineuses ;

2° Des bactéries libres, anaérobies (*Clostridium*) ou aérobies (*Azotobacter*) ;

Des bactéries vivant en association avec des Algues vertes ou bleues.

Ce que nous venons d'apprendre relativement à l'assimilation de l'azote libre par divers microorganismes nous explique d'une manière très satisfaisante l'heureuse influence sur les cultures d'un certain nombre de pratiques agricoles ; c'est dans les couches supérieures du sol que les organismes fixateurs de l'azote sont le plus nombreux, en raison de l'aération plus grande et aussi du développement en surface des Algues ; les substances organiques apportées par les matières humiques sont également plus abondantes en surface ; il en résulte qu'on favorise l'enrichissement du sol en azote combiné en procédant à des labours successifs, qui enterrent la couche superficielle où s'est accumulé l'azote et amènent la formation sur la couche exposée à l'air d'une nouvelle flore d'Algues et de bactéries fixatrices d'azote libre. Ainsi se trouve également expliquée la pratique de la jachère qui a les mêmes avantages qu'une fumure directe ; on a pu évaluer à 10-50 kilos la quantité d'azote gazeux fixé dans ces conditions par an et par hectare.

L'azote ainsi fixé par divers microorganismes sert à l'élaboration de substances protéiques, et ce sont

celles-ci qui se transforment, après la mort des cellules où elles se sont constituées, en les formes ordinaires d'azote combiné, azote ammoniacal et azote nitrique, utilisables par les végétaux supérieurs ; nous verrons que, là encore, interviennent des microorganismes spéciaux et dès maintenant nous arrivons à la notion que tout le cycle de l'azote est dominé dans le sol par l'intervention des bactéries.

CHAPITRE IV

DIGESTIONS DE SUBSTANCES PROTÉIQUES

1. Diastases protéolytiques des Bactéries et des Champignons

Lorsqu'une Bactérie ou un Champignon assimile l'azote d'une substance complexe telle qu'une protéine, il est tout d'abord nécessaire que cette substance subisse une simplification ; elle doit être *digérée* et cette opération est réalisée par le fonctionnement de diastases entièrement comparables à celles que nous avons vu digérer les substances ternaires compliquées ; il s'agit ici de *diastases protéolytiques* ou *protéases*, qu'on peut étudier avec plus de facilité lorsqu'on s'adresse aux microorganismes hétérotrophes que lorsqu'on considère les Phanérogames, parce que ces substances sont alors plus aisées à isoler et qu'on en observe les effets dans les cultures, en dehors des cellules agissantes.

D'une manière générale, dans l'ensemble des êtres vivants, ces diastases, qui ont les propriétés générales des diastases étudiées d'autre part, appartiennent à quatre groupes :

1° Les diastases du groupe de la *pepsine*, qui trans-

forment les protéines en albumoses et peptones et agissent surtout en milieu acide ;

2° Les diastases du type de la *trypsine* ; celle du pancréas des vertébrés agit en milieu alcalin ; elles transforment les protéines en acides aminés, en particulier leucine et tyrosine ; les liquides résultant de son action présentent la réaction du tryptophane ;

3° Les diastases du type de l'*érepsine* de l'intestin des vertébrés ; elles n'agissent pas sur les protéines, mais transforment les protéoses en acides aminés ;

4° Les *présures* ou labferments qui ont une action coagulante sur la caséine.

On ne connaît chez les végétaux que des diastases protéolytiques appartenant aux trois derniers groupes, les plus répandues étant les diastases tryptiques ; mais, contrairement aux trypsines des vertébrés, celles des végétaux agissent le mieux dans des milieux faiblement acides.

C'est à une digestion tryptique que correspond la liquéfaction des milieux nutritifs gélatinés par de nombreuses Bactéries ou par certains Champignons ; on peut se rendre compte de l'existence de telles diastases dans des tissus mycéliens, par exemple, en en déposant un morceau à la surface de gélatine et en constatant la formation d'une zone liquéfiée ; la gélatine appartient au groupe des *albumoïdes*, constitué par des substances protéiques qui ne sont ni des protéines, ni des protéides ; elle présente la réaction du biuret, mais pas celle de Millon ni la réaction xanthoprotéique.

Lorsqu'il s'agit de cultures en milieux liquides il

est possible de précipiter les diastases par l'alcool et de les faire agir ensuite en dehors des cellules qui les ont sécrétées ; on peut encore mettre en évidence les diastases protéolytiques d'un microorganisme en introduisant dans les cultures des morceaux de caséine comprimée, du blanc d'œuf coagulé, etc... Mais des réactions négatives obtenues dans ces conditions ne prouvent pas forcément que le végétal est dépourvu de toute diastase protéolytique ; si celle-ci peut en effet être sécrétée au dehors de certaines cellules vivantes dans le milieu de culture, il existe des organismes qui les retiennent au contraire à l'intérieur de leurs cellules ; il existe ainsi de nombreux cas d'*endotrypsines* ; il se passe pour elles le même phénomène que pour la maltase qui peut ne jamais apparaître à l'intérieur des cellules vivantes ; c'est ainsi que les Levures agissent très lentement ou pas du tout sur la gélatine pour la liquéfier ; mais si on fait agir le jus de presse de ces Levures sur la même substance, l'action digestive est très rapide. Ces endotrypsines peuvent d'ailleurs sortir des cellules lorsque celles-ci sont mortes.

Les trypsines sont très répandues chez les Bactéries, aérobies ou anaérobies, chez les Levures, les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Ustilago*, les Basidiomycètes et les Myxomycètes. Les Champignons parasites des insectes (Isariées) digèrent la chitine et pénètrent dans l'intérieur des téguments ; la chitine appartient, comme la gélatine, au groupe des albumoïdes qui ne sont ni des protéines, ni des protéides.

L'*érepsine* a été mise en évidence chez les Levures et divers Basidiomycètes (*Psalliota*).

Les protéases sont incapables d'agir sur les nucléines et ces substances sont transformées par des diastases spéciales, les *nucléases*, qui provoquent la formation d'acide phosphorique et de bases puriques ; on a isolé de ces nucléases de divers Champignons (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*).

Des *présures* se rencontrent fréquemment chez les Bactéries et chez les Levures.

Rappelons ici l'existence de diastases spéciales telles que l'*arginase*, étudiée chez les Levures, et dédoublant l'arginine en ornithine et urée.

Les produits de la digestion des protéines par les végétaux inférieurs, Champignons et Bactéries, sont assez variables pour une même substance avec l'espèce considérée, en ce sens que la digestion est poussée plus ou moins loin ; c'est ainsi qu'en présence de peptones le *Sterigmatocystis nigra* produit surtout de l'ammoniaque et le *Penicillium glaucum* surtout de la tyrosine et de la leucine (Butkewisch). Cette différence est d'ailleurs en rapport avec la réaction produite par les deux organismes ; le milieu prend une réaction acide avec le *Sterigmatocystis nigra* et une réaction alcaline avec le *Penicillium glaucum* ; si on cultive le *Sterigmatocystis nigra* en ajoutant du carbonate de calcium en excès, de la tyrosine et de la leucine se produisent en abondance ; inversement le *Penicillium glaucum* aboutit à la formation de quantités importantes d'ammoniaque si on acidifie le liquide à l'aide d'acide phosphorique.

La digestion des substances protéiques est également influencée par la pression d'oxygène ; le

Sterigmatocystis nigra transforme la peptone en ammoniaque en présence d'oxygène ; si on supprime ce gaz on obtient seulement des acides aminés ; cela se comprend d'ailleurs par le fait que nous avons déjà signalé de la formation d'ammoniaque à partir des acides aminés par voie d'oxydation.

Autolyse. — Nous venons de considérer des actes de digestion protéolytique opérés par des organismes qui agissent sur des substances se trouvant en dehors d'eux ; cette digestion peut également s'effectuer sur des corps faisant partie constitutive de la cellule ; il s'agit alors d'une autodigestion ou d'une autolyse ; ce phénomène est particulièrement facile à étudier avec des Champignons unicellulaires tels que les Levures ou avec des Mucédinées telles que le *Sterigmatocystis nigra*. Quand une culture a consommé toutes les matières nutritives carbonées et azotées mises à sa disposition, elle utilise les substances qui constituent son protoplasme ; c'est ainsi que les sucres sont brûlés, qu'il se dégage du gaz carbonique et qu'il se constitue des acides organiques ; de même les substances azotées protéiques sont en partie digérées et il apparaît dans le liquide de culture des produits tels que l'ammoniaque et des bases xanthiques issues des nucléoprotéides. Le liquide, de ce fait, tend à prendre une réaction alcaline qui peut être neutralisée par la formation d'acide oxalique.

Il est clair que dans ces conditions la récolte s'abaisse progressivement.

2. Ferments protéolytiques des végétaux supérieurs

On retrouve chez les plantes supérieures les mêmes ferments protéolytiques que chez les Bactéries et les Champignons ; considérons-les successivement dans la graine et les différents organes essentiels de ces plantes.

On peut mettre en évidence les diastases tryptiques des protéines dans les graines à l'état de vie ralentie ou, pour d'autres, seulement au moment de la germination par différents procédés ; on peut faire agir des extraits glycérinés sur une protéine telle que la caséine en poudre et constater la dissolution de celle-ci ; le liquide présente la réaction du biuret et on peut déceler la présence d'acides aminés tels que la leucine et la tyrosine ; ou bien on fait agir le jus de presse ; on peut encore procéder à l'extraction des diastases par le chloroforme, ou faire agir directement les plantules desséchées et pulvérisées en présence de thymol ; il est enfin possible, par l'action de l'alcool sur l'extrait glycériné, de précipiter un ensemble de substances comprenant les ferments protéolytiques.

Toutes ces diastases tryptiques, rencontrées dans un très grand nombre de graines (Orge, Chanvre, Lin, Lupin, Fève, Ricin...), agissent le mieux, comme celles que nous avons envisagées, en milieu légèrement acide (0,2 p. 100 d'acide chlorhydrique par exemple).

Des faits de tout point comparables s'observent pour les bulbes et les tubercules au moment de la reprise de végétation.

Toutes ces diastases amènent la transformation des protéines en substances capables de passer d'une cellule à l'autre et permettent ainsi la migration des matières azotées de réserve vers les régions en voie de croissance. Cette migration est particulièrement facile à mettre en évidence à partir des graines ou des organes de réserve analogues (tubercules, bulbes, pollen, spores, propagules...) pour lesquels il s'agit de réserves d'une assez longue durée ; ces mêmes phénomènes se produisent également dans la feuille pour laquelle il s'agit au contraire d'un emmagasinement quotidien de substances protéiques ; nous sommes en présence d'un parallélisme des plus nets entre les protéines et les polysaccharides de réserve.

Nous avons déjà signalé le fait qu'au moment de la germination les protéines sont transformées en substances telles que les acides aminés et il nous suffira d'indiquer les nombres suivants, qui se rapportent au Lupin, pour constater que l'augmentation en asparagine est parallèle à la diminution des protéines.

Durée de la germination	Perte en azote protéique	Gain en azote d'asparagine
—	—	—
4 jours	9,1	3,3
7 —	23,1	11,2
12 —	37,9	22,3
15 —	42	25,7

Les germinations en question se rapportent à des expériences faites à l'obscurité, c'est-à-dire dans des conditions où les phénomènes que nous voulons mettre en évidence ne sont pas masqués par les phénomènes inverses aboutissant à la constitution de substances protéiques ; Boussingault avait déjà attiré l'at-

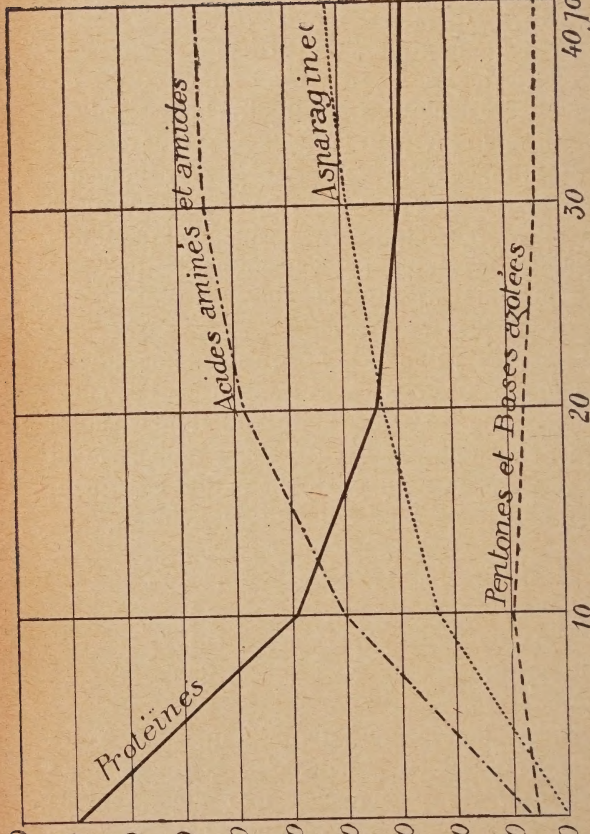


Fig. 29.

Transformation des matières azotées pendant la germination de *Vicia sativa*; on a porté en ordonnées les quantités d'azote correspondant aux différents groupes de substances azotées.

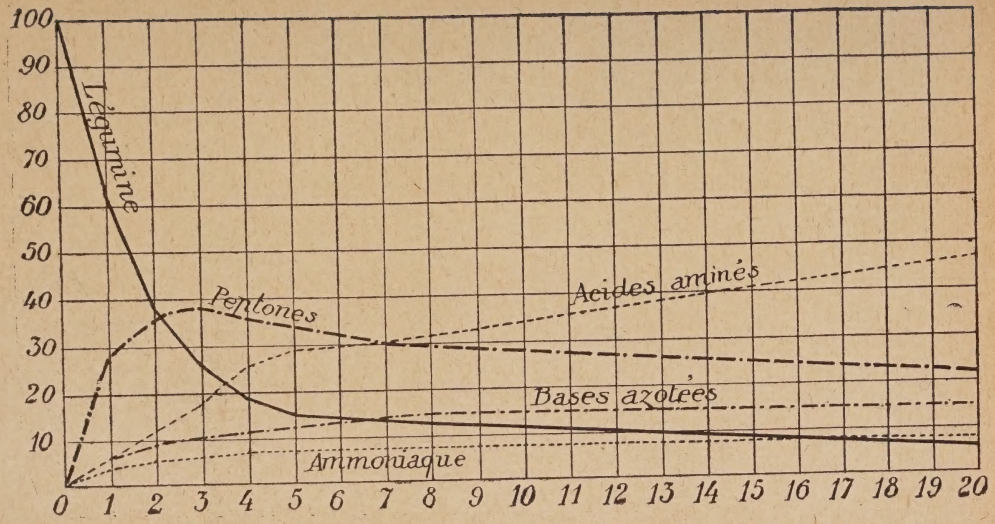


Fig. 30. — Hydrolyse de la légumine sous l'action de l'acide sulfurique à 4 p. 100 à l'ébullition; on a porté en ordonnées les quantités d'azote correspondant aux divers groupes de substances azotées.

tention sur la formation de l'asparagine dans de telles germinations.

L'asparagine que nous considérons spécialement ici apparaît d'ailleurs comme allant en augmentant alors que les autres acides aminés disparaissent au contraire ; c'est ainsi que dans le Pois on trouve, au bout d'une semaine de germination, une grande quantité de leucine et pas trace d'asparagine, alors que c'est le contraire au bout de trois semaines ; nous avons déjà expliqué le fait par la formation d'ammoniaque à partir d'une molécule d'acide aminé proprement dit et l'amidation d'une autre molécule qui aboutirait ainsi, par un processus d'oxydation, à la formation d'asparagine.

Il n'est pas sans intérêt de signaler le fait que les transformations que subissent les substances protéiques au cours de la germination d'une graine sont très différentes de ce qu'on observe quand on traite celles-ci par les acides étendus ; on peut facilement comparer les deux phénomènes grâce aux deux diagrammes représentés par les figures 29 et 30, empruntés à Prianichnikov. Le premier (fig. 29) se rapporte aux transformations des matières protéiques pendant la germination de *Vicia sativa* ; on voit que les courbes représentant à chaque instant la teneur en azote protéique d'une part, en azote aminé et amidé et en azote de l'asparagine d'autre part sont des courbes sensiblement inverses ; l'asparagine croît en particulier d'une manière très régulière ; les peptones n'apparaissent qu'en très petite quantité et ne subissent pas de variation appréciable.

Sous l'action de l'acide sulfurique à 4 p. 100 à

l'ébullition (fig. 30), la légumine est très rapidement hydrolysée ; il se forme une grande quantité de produits intermédiaires non cristallisables, les peptones ; on voit d'autre part se produire des acides aminés en même temps que des bases azotées et de l'ammoniaque ; mais, et c'est le point capital, il n'apparaît pas trace d'asparagine et l'absence de ce corps ne peut pas s'expliquer par sa destruction sous l'action de l'acide qui réalise l'hydrolyse, car la quantité d'acide aspartique qui apparaît est sans rapport avec celle de l'asparagine qui se forme dans les graines en voie de germination.

On est donc conduit à admettre que dans le phénomène de la germination il se superpose aux travaux d'hydrolyse effectués par les diastases protéolytiques des actions secondaires amenant la formation de nouveaux corps, au nombre desquels l'asparagine attire particulièrement notre attention.

Palladine a montré que la dislocation des protéines dans les graines est influencée, qualitativement et quantitativement, par le phénomène respiratoire ; en opérant sur des plantules de Blé, à l'abri de l'oxygène, il a observé que les quantités suivantes de protéines ont été consommées (rapportées à 100 de protéines initiales) :

Durée	Protéines consommées
22 heures	1,1
24 —	3,9
2 jours	15,4
3 —	26,1

alors qu'en présence d'oxygène les quantités de pro-

téines décomposées sont représentées par les nombres ci-dessous :

24 heures	7,9
2 jours	17,2
3 —	54,3

D'autre part lorsque l'oxygène intervient, il se forme surtout de l'asparagine, alors que la tyrosine et la leucine apparaissent en quantité insignifiante ; en l'absence d'oxygène c'est l'inverse qui se produit et les acides aminés simples qui se constituent alors doivent être considérés comme les premiers produits de l'hydrolyse des protéines, l'asparagine apparaissant au contraire, comme nous avons déjà été amenés à le reconnaître, comme un produit secondaire, résultant d'une transformation des acides aminés.

Ces résultats sont tout à fait de même ordre que ceux que nous avons signalés pour les Champignons.

Les expériences de Palladine éclairent l'origine de l'asparagine dans les graines en voie de germination ; il s'agirait d'une substance dérivant par un processus d'oxydation des acides aminés qui se forment par hydrolyse des matières protéiques ; une molécule d'asparagine résulterait de deux molécules d'acides aminés ; l'une de ces molécules se dégraderait par oxydation jusqu'à la formation d'ammoniaque, l'autre aboutirait à la formation d'acide aspartique qui, en présence de l'ammoniaque, donnerait de l'aspartate d'ammonium, puis de l'asparagine. La formation de l'asparagine serait donc comparable à celle de l'urée chez les animaux, substance dérivant du carbonate d'ammonium, qui lui-même résulte d'une oxydation des acides aminés ; la grande différence entre les deux

sortes d'êtres vivants est que chez les animaux l'urée est définitivement perdue pour l'organisme, alors que chez les plantes l'asparagine peut être reprise par une nouvelle synthèse des substances protéiques.

Ce ne sont pas d'ailleurs que les substances protéiques de réserve qui sont ainsi susceptibles d'être digérées dans la plante ; il en est de même des protéines dites formatives ; c'est ainsi que dans les plantules germant à l'obscurité on voit apparaître des bases xanthiques, de l'adénine, de la guanine, de la xanthine, de l'hypoxanthine, dérivant des acides nucléiques. On a constaté (Karpetoff et Sobaschnikoff) que dans la première période de germination la quantité des nucléoprotéides augmente, bien que la quantité totale de protéines diminue ; ce n'est qu'ensuite que se produit une dislocation des protéines difficilement digestibles.

Zaleski, qui a étudié le sort des nucléoprotéides pendant l'inanition de la plante, est arrivé à conclure que ces substances ne subissent une transformation profonde que dans les cellules mortes.

On peut suivre la transformation des nucléoprotéides par la production de phosphore inorganique (Iwanoff) ; on observe, par exemple, les quantités suivantes des différentes formes de phosphore dans les graines de Fève germant à l'obscurité :

	o/o de P total		
		Plantules de	
	Graine	5 jours	20 jours
P minéral	11,4	48,1	80,2
P de lécithines	11,6	—	6,6
P de protéides	52,5	37,4	13,7
P de phosphates organiques.	25,7	9,8	5,1

On voit qu'au bout de vingt jours la majeure partie du phosphore se trouve à l'état de phosphore minéral.

Zaleski a obtenu des résultats analogues, mais il a montré de plus que dans les nouveaux organes de la plantule le phosphore protéique se trouve augmenter très sensiblement, par suite de phénomènes de synthèse consécutifs à ceux de la digestion ; on a pour les organes de nouvelle formation chez la Fève les quantités suivantes d'azote et de phosphore protéiques :

	3 jours	9 jours
Azote protéique.	85	375,5
Phosphore protéique	12,5	33,7

Si on s'adresse aux feuilles, qu'on les considère, au point de vue de leur composition en azote, le soir et le matin, et qu'on rapporte les chiffres obtenus *à une même surface foliaire*, on obtient les résultats suivants (Vigne) :

	Azote total	Azote protéique	Azote soluble
Soir.	3,54	3,20	0,34
Matin	3,26	3,05	0,21

On voit que la feuille perd au cours de la nuit des substances azotées qui émigrent de la feuille vers la tige ; cette migration correspond à une digestion des protéines et à la diffusion des substances qui en proviennent. Remarquons qu'il est très important de ramener les chiffres à une même surface foliaire ; si on les rapportait à 100 de substance sèche on trouverait le matin les nombres suivants :

Azote total	Azote protéique	Azote soluble
3,62	3,38	0,24

qui feraient croire à une formation de substances protéiques aux dépens des substances azotées solubles pendant la nuit ; cette contradiction apparente tend à ce que pendant la nuit la feuille se trouve perdre environ 1/10e du poids de sa substance sèche, par suite de la consommation et de la migration des sucres.

A côté de ces migrations diurnes qui s'opèrent dans la feuille, il en est qui s'effectuent à la fin de la végétation de cet organe, à l'automne, et qui sont tout à fait comparables à celles que nous avons vu se produire dans les mêmes conditions pour les substances ternaires ; à cette époque la synthèse des substances protéiques se ralentit, puis s'annule et celles qui se sont accumulées antérieurement dans la feuille subissent une digestion et émigrent vers la tige.

Citons, à titre d'exemples, les valeurs du taux de l'azote soluble, par rapport à 100 d'azote total, dans les feuilles de Hêtre, au moment où elles jaunissent :

	Azote total p. 100 de substance sèche	Azote soluble p. 100 d'azote total
10 octobre (f. vertes). .	2,22	8,5
1er novembre (f. d'un vert jaunâtre)	1,21	24
2 novembre (f. jaunes).	0,94	30,9

L'azote soluble augmente beaucoup par rapport à l'azote protéique au moment du jaunissement en même temps que la quantité d'azote total subit une grande réduction.

On observe les mêmes phénomènes chez des plantes vertes, antérieurement développées à la lumière et qu'on place à l'obscurité ; si on transporte par exemple des plantules d'Avoine de la lumière à l'obscurité

et qu'on les abandonne ainsi sept jours, on constate (Schulze) que les teneurs en azote total, azote protéique et azote soluble sont les suivantes, rapportées à 100 de matière sèche :

	Début	Fin
Azote total	4,12	4,50
— protéique	3,51	1,46
— soluble	0,61	3,04

Plus de la moitié des protéines a été transformée en substances plus simples à l'obscurité.

En outre des diastases tryptiques présentées par les organes de réserve des végétaux supérieurs on en a signalé, et de très actives, dans des organes ou des tissus où leur rôle n'apparaît pas avec clarté ; l'une des plus étudiées est la *papaïne*, qui se trouve dans le latex du *Carica Papaya*. D'autres s'observent dans plusieurs Broméliacées, telle est la *broméline* du fruit de l'ananas ; les fruits de diverses Cucurbitacées en possèdent également (*Cucumis utilissima*, *Ecbalium elaterium*...), ainsi que le latex des *Ficus*. On obtient des digestions *in vitro* très faciles avec ces diastases, mais leur localisation ne paraît pas en rapport avec un acte physiologique correspondant chez la plante.

On peut en dire de même des *présures* végétales qui sont, elles aussi, très répandues et se trouvent agir très énergiquement sur des substances qui n'ont pas leur équivalent chez la plante. Le suc de *Carica Papaya* en contient une qui détermine la coagulation du lait avant que la papaïne n'agisse pour amener une redissolution correspondant à l'hydrolyse du coagulum de caséine. Depuis longtemps on connaît et on

utilise certaines plantes pour provoquer ainsi la coagulation du lait en vue de la fabrication des fromages; c'est le cas des tiges ou des fruits du Figuier, des graines de *Galium verum*, des capitules d'Artichaut, des graines de Pois et de Lupin (*L. hirsutus*), des graines de Ricin en germination ; la plupart des feuilles de Phanérogames sont d'ailleurs douées de cette propriété avec une intensité plus ou moins considérable (*Pinguicula, Medicago, Geranium, Ranunculus, Anthriscus...*) [Javillier]. L'action des différentes présures nécessite la présence d'un sel de calcium jouant le rôle de codiastase.

Gerber a montré que le latex de *Broussonetia papyrifera* renferme à la fois une présure, une lipase et une amylase ; dans le *Ficus Carica* c'est la protéase qui domine et l'amylase fait défaut.

3. Plantes carnivores

Les phénomènes de digestion des substances protéiques nous amènent naturellement à considérer une catégorie de plantes très intéressantes au point de vue biologique, celle des plantes carnivores et plus spécialement insectivores. On a été depuis longtemps frappé du fait que certains végétaux présentent de très curieuses formations liées à la capture des insectes et sur lesquelles Ch. Darwin a longuement attiré l'attention; ils appartiennent à quatre catégories principales.

1° Plusieurs de ces plantes présentent des *urnes* ou des productions analogues développées aux dépens

des feuilles et dans lesquelles se trouvent emprisonnés de petits animaux qui sont destinés à y périr.

Le type de ces végétaux est réalisé par les *Nepenthes* (fig. 31) (famille des Népenthées, voisine des Droséracées) ; la partie distale des feuilles de ces plantes tropicales est réduite à une nervure principale arrondie qui se différencie vers son extrémité en une sorte d'ascidie, c'est-à-dire en une production tubuleuse, ayant l'aspect d'un réservoir ; cette sorte de vase se redresse verticalement, l'orifice étant situé à la partie supérieure ; à quelque distance de l'ouverture se trouve enfin une sorte de couvercle représentant la partie terminale élargie de la nervure principale, mais ne fermant pas l'urne dont elle dépend. Des productions analogues se retrouvent dans les *Sarracenia* (fig. 32) (famille des Sarracéniées, voisine des Droséracées) et chez les *Cephalotus* (fig. 33) (Saxifragées).

Fig. 31.
Urne de *Nepenthes villosa*.

Dans toutes ces urnes on observe à la surface de la paroi interne et à l'ouverture même des poils orientés de haut en bas (fig. 32 B) ; leur disposition donne à penser qu'ils s'opposent à la sortie des petits animaux

qui se sont introduits à l'intérieur de ces sortes de pièges. D'autre part, ces urnes se comportent comme des réservoirs d'eau de pluie et ont, de toute évidence, un rôle dans l'alimentation en eau de la plante ; on peut encore observer du liquide à leur intérieur après une semaine de sécheresse.

Enfin on remarque souvent à l'orifice des urnes, par exemple dans le *Sarracenia purpurea*, des poils

Fig. 32. — *Sarracenia purpurea.*
A, feuilles creusées en ascidies ; B, épiderme de la paroi interne des urnes, garni de poils dirigés vers le bas.

glanduleux qui sécrètent une substance sucrée attirant les insectes ; sans préjuger des conséquences qui peuvent en résulter pour la nutrition des plantes en question, on observe en fait dans de telles urnes, d'abondants débris d'insectes qui se sont décomposés dans le liquide ; on a pu par exemple constater dans les urnes de *Sarracenia variolaris*, qui atteignent 30 centimètres de long, un dépôt de 8 à 10 centimètres

d'épaisseur, constitué par des restes d'ailes, de pattes,

Fig. 33. — *Cephalotus follicularis*, plante carnivore dont certaines feuilles sont différenciées en urnes.

de téguments de coléoptères, de diptères, de four

mis, etc... ; il s'agit donc bien de productions funestes aux Insectes.

Un groupe de plantes rentrant dans cette même

Fig. 34. — *Lathræa squamaria.*

catégorie comprend celles dont les feuilles présentent des cavités dont l'orifice ne permet que l'introduction de très petits animaux ; c'est le cas du *Lathræa Squa-*

maria (fig. 34) ; les cavités en question sont tapissées par des poils glanduleux (fig. 35) auxquels on attribue la propriété d'engluer les insectes et de les digérer ; ce groupe se rapproche par ce dernier caractère des

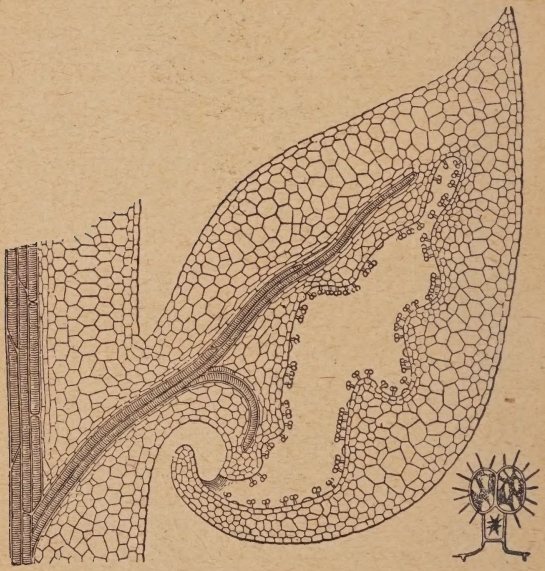


Fig. 35. — Feuille de *Lathrœa Squamaria*, coupée suivant son plan de symétrie et présentant une cavité tapissée de poils glanduleux.

plantes que nous allons faire rentrer dans la troisième catégorie.

Enfin nous devons signaler les productions signalées sous le nom *d'utricules*, apparaissant dans un certain nombre de plantes aquatiques et spécialement chez les Utriculaires (fig. 36) ; il s'agit de plantes

dépourvues de racines, submergées; les pédoncules floraux émergent seuls dans l'air. La figure 37 (1, 2) représente les différenciations très spéciales des feuilles

Fig. 36. — *Utricularia minor;* aspect général de la plante.

laciniées de ces végétaux ; il s'agit de petites vésicules dont l'orifice est garni de poils, disposés les uns vers l'extérieur, les autres vers l'intérieur ; de petits animaux (surtout des crustacés tels que des Daphnies,

Cyclops, Cypris, des larves d'insectes, des vers, des Infusoires), peuvent pénétrer à l'intérieur de la cavité en écartant les poils internes, mais ne peuvent pas plus en sortir que d'une nasse, et pour les mêmes raisons. L'intérieur de ces vésicules est tapissé de poils ramifiés auxquels on a attribué un rôle digestif et absorbant (fig. 37, 3) ;

2° Une seconde catégorie de plantes carnivores est constituée par les plantes à *pièges* qui se ferment par

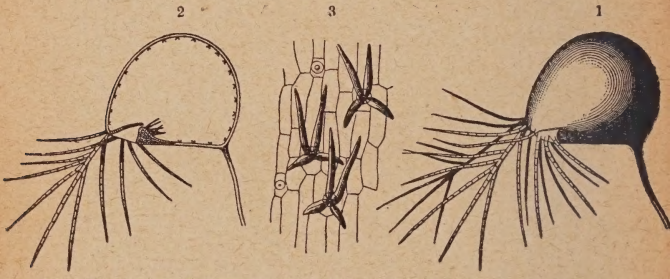


Fig. 37. — Utricule d'*Utricularia neglecta*; 1, vue d'ensemble; 2, en coupe longitudinale; 3, poils absorbants disposés sur la paroi interne.

le fait de l'excitation provoquée par les insectes se déplaçant à leur surface ; il s'agit de dispositions toutes particulières pour lesquelles on comprend qu'on ait été tenté de proposer l'explication finaliste qui se traduit par le qualificatif qu'on a attribué aux végétaux qui les présentent.

Les plus caractéristiques de ces plantes sont représentées par le *Dionœa muscipula* (attrape-mouche) (fig. 38) et l'*Aldrovandia vesiculosa* (fig. 39), appartenant toutes deux à la famille des Droséracées. La Dionée est un végétal des tourbières de l'Est de l'Amérique

du Nord, dont les feuilles disposées en rosette ont un pétiole élargi en limbe dans sa partie inférieure (fig. 40, A); puis ce pétiole s'arrondit dans une zone

Fig. 38. — *Dionœa muscipula.*

médiane pour se terminer enfin par deux larges expansions symétriques, fortement dentées sur les bords, disposées dans un même plan au repos, mais capables, lorsqu'elles viennent à subir une excitation

mécanique, de se rapprocher l'une contre l'autre, la nervure médiane servant de charnière.

A la surface supérieure de la partie centrale de chacune de ces deux expansions semi-circulaires, on observe trois poils épineux et de nombreuses petites glandes presque sessiles, constituées par vingt-huit cellules, colorées en rouge et sécrétant un liquide mucilagineux ; cette région ne réagit pas à la suite d'une excitation provoquée sur la face inférieure, mais, si un corps inerte ou un insecte vient à déterminer une excitation à la face supérieure, les deux parties symétriques se rapprochent et se trouvent emprisonner le corps ou l'animal dans un temps assez court, variant de dix à trente secondes.

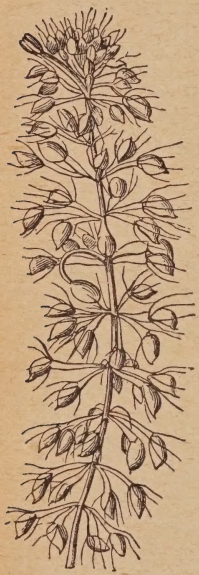
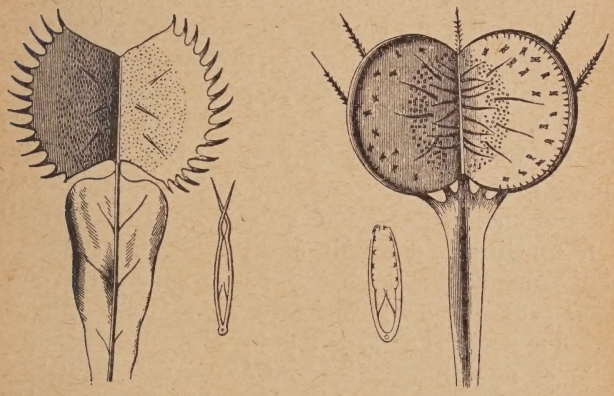


Fig. 39.
Aldrovandia vesiculosa.

S'il s'agit d'un corps inorganique, tel qu'un grain de sable ou d'un corps organique non azoté, les choses en restent là et bientôt la partie sensible de la feuille s'ouvre à nouveau ; si au contraire la substance qui a déterminé la réaction motrice est azotée ou s'il s'agit d'un petit animal, la fermeture dure un temps beaucoup plus long et il s'effectue une abondante sécrétion des poils glanduleux ; le liquide produit, qui est incolore, mucilagineux, et présente une réac-

tion acide, entoure la substance emprisonnée et peut être assez abondant pour se traduire par la formation de grosses gouttelettes ; il s'effectue une dissolution des substances azotées, puis une absorption, et le piège reprend sa position d'attente, mais seulement au bout de huit à vingt jours, suivant la taille de l'objet qui a provoqué sa fermeture.

Il se passe des phénomènes tout à fait du même ordre chez l'*Aldrovandia* (fig. 39) qui est une plante



A B

Fig. 40. — Feuilles-pièges : A, de Dionée attrappe-mouche ; B, d'*Aldrovandia vesiculosa*.

aquatique de l'Europe méridionale ; la figure 40 B représente l'extrémité d'une feuille dont la structure offre les plus grandes ressemblances avec celle de la Dionée et qui se comporte de la même manière ; à la surface supérieure des deux moitiés élargies se trouvent des poils glandulaires (fig. 40, B) ; que des Diato-

mées, des *Cyclops*, des *Daphnies*, des *Cypris*, des larves d'insectes viennent à exciter la face supérieure de ces formations, il s'effectue une brusque fermeture qui peut subsister pendant quelques jours, au bout desquels on ne trouve plus que des débris squelettiques des animaux emprisonnés.

3° Dans une troisième catégorie, nous placerons les plantes dites carnivores qui présentent encore des phénomènes actifs de captation, mais ne correspondant pas à des formations aussi nettement différenciées que celles que nous venons de signaler. C'est par exemple le cas des *Pinguicula* (Utriculariées), plantes des tourbières froides, dont l'espèce la plus répandue est le *P. vulgaris*; ses feuilles simples ont leurs bords relevés vers le haut et forment ainsi une gouttière qui se trouve enduite d'un mucilage incolore, sécrété par de nombreuses glandes, les unes visibles à l'œil nu, constituées par huit à seize cellules groupées d'une manière radiaire à la partie supérieure d'un long pédicelle, les autres formées de huit cellules, presque sessiles; enfin de nombreuses cellules épidermiques non différenciées sont également sécrétrices. En présence d'une substance organique azotée il s'effectue une abondante sécrétion acide qui a des propriétés digestives; si un insecte vient à exciter la face supérieure d'une telle feuille, il se produit également une vive réaction sécrétrice acide et de plus un enroulement des bords du limbe qui subsiste jusqu'à ce que l'insecte soit digéré.

Dans les *Drosera* (fig. 41) ce n'est plus le limbe qu détermine l'emprisonnement des insectes, mais les poils glanduleux eux-mêmes ; les feuilles de ces

plantes de tourbières ont un limbe arrondi ou ovale, dont la surface supérieure et les bords présentent des

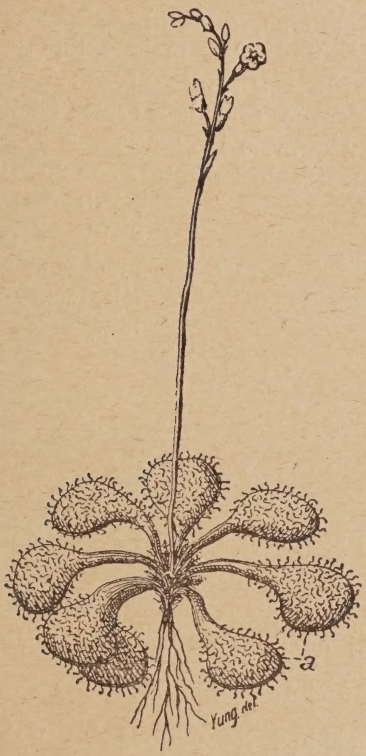
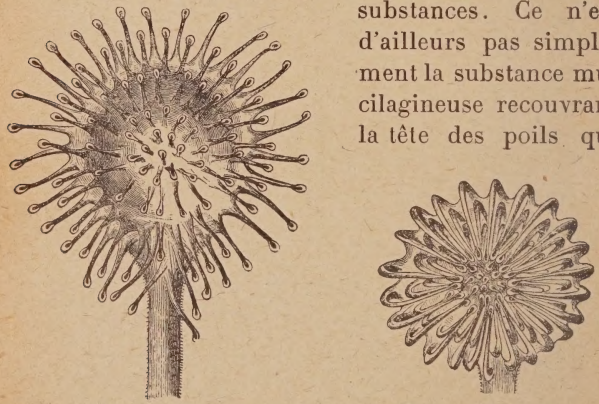


Fig. 41. — *Drosera rotundifolia.*

poils très développés, longuement pédicellés et se terminant par une tête rouge sécrétrice ; ils sont d'autant plus longs qu'ils sont situés plus près du bord et

on en compte environ deux cents par limbe. Une excitation produite par des corps inorganiques (sable, verre, charbon...), ou par des substances organiques non azotées (gomme, sucre...), détermine bien une sécrétion acide des poils, mais le liquide est alors dépourvu de diastase protéolytique ; si c'est au contraire une substance organique azotée (viande) ou un insecte qui détermine l'excitation, la sécrétion produite devient capable d'effectuer une digestion de ces substances. Ce n'est d'ailleurs pas simplement la substance mucilagineuse recouvrant la tête des poils qui



A B

Fig. 42. — *Drosera rotundifolia;* limbes de feuilles : A, à l'état de repos; B, venant d'être excité par un insecte qui se trouve emprisonné par les poils glanduleux.

se trouve engluer les petits animaux venant à se poser sur la feuille ; il se produit en outre un mouvement d'incurvation des poils qui convergent vers la région excitée et concourent à emprisonner les bestioles ; le phénomène est représenté par les figures 42 qui donnent une idée de l'aspect des feuilles au repos

et des feuilles excitées ; le phénomène dure de deux à trois heures dans son ensemble et il n'est pas rare de

Fig. 43. — *Drosophyllum lusitanicum.*

rencontrer sur une même feuille des débris de dix à quinze insectes.

4° Le cas des *Drosera* nous conduit enfin à envisager une quatrième catégorie de plantes carnivores, celles qui retiennent simplement les insectes par le

mucilage que sécrètent les poils glanduleux qui n'offrent plus de mouvements réalisant une captation ; c'est le cas des *Drosophyllum* (fig. 43) (Droséracées) qui se développent dans des stations sablonneuses et sèches ; tout l'appareil végétatif (tiges et feuilles linéaires) est couvert de poils glanduleux très développés, terminés par une tête rouge globuleuse, brillant au soleil du fait du liquide sécrété ; il existe en outre de nombreuses petites glandes sessiles qui paraissent produire un liquide acide et doué de propriétés digestives.

De nombreuses autres plantes présentent également des poils à sécrétion mucilagineuse, capable d'engluer les insectes (*Primula viscosa, P. villosa, Saxifraga tridactylites, Silene viscosa, Ledum villosum...*) sans que la notion de plantes carnivores se soit d'ailleurs étendue à tous ces cas.

Je crois nécessaire de faire observer qu'il y a certainement dans la signification des phénomènes que nous venons de signaler une certaine part d'interprétation et la question doit être examinée de plus près au point de vue de la digestion des substances azotées et à celui des conséquences qui en résultent pour les plantes qui nous occupent.

Une des plantes les mieux étudiées à cet égard est le *Nepenthes melamphora* que Clautriau a considéré à Java, dans les conditions normales de sa végétation. Le contenu des urnes, qui ne provient pas que de l'eau de pluie, mais est en partie sécrété par la plante, est incolore, légèrement mucilagineux et possède une légère saveur de miel, qui s'accentue lorsque les insectes y sont tombés ; le liquide normalement neutre

présente une réaction très franchement acide quand l'urne est excitée par les mouvements de petits animaux. La digestion peut s'effectuer en l'absence de toute bactérie, mais l'auteur n'a pu reconnaître l'existence de peptone, de leucine, ni de tyrosine; il pense que ces substances sont absorbées par l'urne aussitôt produites.

Pour Vines l'acidité du liquide sécrété est due à de l'acide formique et, si on fait agir le liquide *in vitro* sur de la fibrine, on constate qu'elle est hydrolysée dans l'espace d'une heure; on n'a plus les réactions de précipitation des substances protéiques, mais on obtient encore celle du biuret. L'extrait glycériné des urnes agit aussi par une diastase, mais moins activement que la sécrétion même des urnes excitées.

R. Dubois, Couvreur ayant émis l'hypothèse qu'on est ici en présence de digestions d'origine bactérienne, Vines a montré que l'hydrolyse existe encore en présence d'antiseptiques (glycérine concentrée au 1 p. 100 d'acide cyanhydrique); d'après lui il se produirait des albumoses, des peptones, de la leucine et du tryptophane (réaction tryptique); l'extrait glycériné des feuilles de *Drosera* ou de *Drosophyllum* présente des propriétés protéolytiques très nettes, et la diastase agissante peut être précipitée par l'alcool, sans perdre de son activité.

On a rapporté à des acides organiques (formique, propionique, butyrique, citrique, valérianique) l'acidité du liquide sécrété par les poils des *Drosera* et capable de digérer le blanc d'œuf, la viande et la gélatine.

Völcker a donné de son côté par l'extrait sec du

liquide des urnes de *Nepenthes*, la composition suivante :

Acides malique et citrique	39	p. 100
KCl	50	—
CO^3Na^2	6	—
Ca	2,6	—
Mg	2,6	—

Etudiant les glandes de *Drosophyllum lusitanicum* au point de vue histologique, C. França vient de mettre en évidence des modifications très apparentes subies par les cellules profondes ; alors qu'au moment de l'absorption de substances animales les cellules superficielles ne subissent aucune modification et se comportent uniquement comme sécrétrices, les cellules profondes changent d'aspect au moment où la glande est mise en contact avec une émulsion des tissus d'un insecte ; leur cytoplasme présente rapidement des granulations sphériques, noires, qui au bout de quelques heures, deviennent moins nombreuses mais plus volumineuses.

Quelle est la part qui revient, dans ces phénomènes de digestion, à la nutrition générale des plantes envisagées? D'après certaines recherches, des pousses d'Utriculaire présenteraient un développement deux fois plus considérable lorsqu'elles sont nourries avec des insectes ; d'après Büsgen des pieds de *Drosera* à qui on fait digérer des petits morceaux de viande ou des insectes, tels que des Pucerons, sont sensiblement plus robustes que des individus témoins ; le nombre de feuilles est accru, ainsi que celui des rameaux florifères (3 au lieu de 1), celui des fleurs (5 au lieu de 1) et celui des graines ; le poids de substance sèche passe de 1 à 1,5-3, le poids des graines se trouve doublé.

Il convient de remarquer que d'autres auteurs n'ont pas obtenu ces résultats et il faut bien avouer qu'il subsiste encore beaucoup d'incertitude sur la signification et la valeur de cette digestion ; ce qui est certain d'autre part c'est que les plantes en question peuvent se développer normalement sans qu'aucune substance protéique soit mise en contact avec les organes singuliers qu'elles possèdent ; peut-être faut-il considérer ces plantes comme assimilant plus facilement les peptones que les nitrates ou l'ammoniaque ; ce seraient alors des plantes semi-autotrophes et semi-hétérotrophes, en ce qui concerne du moins la nutrition azotée, car elles se comportent comme franchement autotrophes à l'égard de la nutrition carbonée.

Il reste encore beaucoup d'imprécision et d'obscurité dans cette question des plantes carnivores, qui réclame une étude expérimentale d'ensemble ; née de considérations purement morphologiques, cette notion a besoin d'être contrôlée par des recherches chimiques précises. Il n'est pas sans intérêt de signaler le fait que dans le liquide des urnes de *Nepenthes* on constate l'existence constante de divers insectes, de sept Diptères en particulier, qui y effectuent tout leur développement normal ; il faudrait admettre pour eux l'existence d'une antidiastase ; d'autre part nous avons constaté que des diastases protéolytiques existent dans bien des organes ou tissus végétaux, sans que la chose implique pour eux un caractère carnivore.

Les Utriculaires paraissent se comporter un peu différemment des plantes carnivores proprement dites ; les insectes ou autres petits animaux qui se

sont introduits dans les vésicules y meurent de faim plus ou moins rapidement et paraissent bien être digérés par des bactéries ; on n'a pu en effet mettre en évidence de diastase propre au végétal ; les excré-

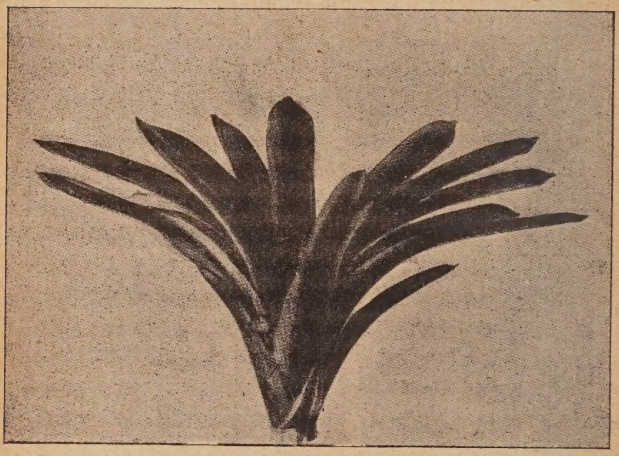


Fig. 44. — *Thecophyllum sp.*, Broméliacée dont les feuilles délimitent une coupe retenant l'eau de pluie.

ments et les cadavres subissant une putréfaction fournissent des substances de dédoublement qui peuvent constituer une source d'azote accessoire pour la plante ; il ne s'agirait donc que d'un cas qui se trouve réalisé pour beaucoup de plantes se développant en présence de matières organiques.

Il se passerait plus particulièrement pour les Utriculaires quelque chose d'analogue à ce qu'on observe chez plusieurs plantes épiphytes tropicales qui retiennent de l'eau entre leurs feuilles et parmi

lesquelles il convient de citer les Broméliacées, étudiées à cet égard par Schimper et Picado. Ces végétaux ont leurs feuilles étroitement appliquées les unes contre les autres et, en s'embriquant par leurs bords, elles constituent un réservoir dans lequel l'eau de condensation des brouillards peut s'accumuler (fig. 44); il y tombe divers débris végétaux et animaux et il se forme un véritable aquarium dans lequel se développe une faune très spéciale ; or l'eau de ce réservoir se trouve être particulièrement exempte de substances minérales et organiques ; la chose s'explique par la production de diastases protéolytiques contenue dans une sécrétion gommeuse et par la résorption rapide des produits de la digestion qui en résulte ; pour ces végétaux, dépourvus de racines, les feuilles se trouvent constituer l'appareil absorbant ; nous retrouvons donc ici une nutrition azotée accessoire à la base de laquelle existe d'ailleurs un phénomène de digestion opéré par la plante elle-même, mais dont l'action s'exerce sur des débris organiques morts et non plus sur des êtres vivants.

CHAPITRE V

TRANSFORMATION ET ROLE DES SUBSTANCES AZOTÉES

Ce n'est que par un besoin de clarté dans l'exposition que nous avons été amenés à étudier successivement les transformations que subissent du fait des cellules végétales les substances ternaires d'une part, les substances azotées d'autre part ; mais les différentes fonctions présentées par les plantes ne connaissent pas cette distinction et les deux sortes de matériaux sont capables de réagir les uns sur les autres ; nous en avons déjà vu un exemple dans le fait de l'intervention des sucres dans la formation des acides aminés.

Nous étudierons tout d'abord ici plusieurs autres exemples analogues et traiterons ensuite des phénomènes de fermentation présentés par les matières azotées.

1. Les substances azotées dans le phénomène respiratoire

Nous avons défini la respiration comme un phénomène caractérisé par des échanges d'oxygène et de

gaz carbonique s'effectuant entre le milieu extérieur et la plante, correspondant par conséquent à des oxydations qu'on est amené à regarder comme constituant une source d'énergie, en même temps qu'une perte de matière, pour la plante. Nous avons uniquement considéré, dans le volume précédent, les substances ternaires parmi celles qui subissent de telles oxydations et, en fait, ce sont elles qui paraissent jouer le rôle passif essentiel. Nous avons même été conduits à admettre, avec PALLADINE, que, pour certains organes tout au moins, les substances ternaires sont les seules à jouer le rôle de combustibles, aux substances protéiques revenant au contraire un rôle actif dans le phénomène.

Il nous faut cependant revenir sur le phénomène de la respiration en ce qui concerne les substances azotées, certaines d'entre elles pouvant prendre part aux échanges gazeux envisagés, soit d'une manière directe, soit d'une manière indirecte.

La chose est particulièrement facile à mettre en évidence dans le cas des microorganismes capables de se développer à partir d'une unique substance organique se comportant à la fois comme source de carbone et comme source d'azote. C'est ce qui se produit, par exemple, en ce qui concerne l'*Isaria densa*, pour le glycocolle, la leucine, l'asparagine, l'albumine de l'œuf ou du sang, la gélatine.

Avec ces différentes substances le quotient respiratoire est toujours très sensiblement inférieur à l'unité ; il prend, par exemple, les valeurs suivantes, qu'on peut comparer à celles qu'on observe quand, au milieu nutritif contenant une des

substances azotées, on ajoute un sucre tel que du saccharose :

	0 Saccharose	Saccharose
Glycocolle	0,61	1,38
Leucine	0,63	1,31
Asparagine	0,62	1,25
Ovalbumine	0,51	0,83
Gélatine	0,74	1,04

Le relèvement de la valeur du quotient respiratoire en présence de saccharose correspond d'ailleurs à une utilisation beaucoup plus faible de la matière azotée.

Nous retrouvons ici un nouvel exemple de l'influence de la composition du milieu nutritif sur le quotient respiratoire, venant s'ajouter à tous ceux que nous avons mis en évidence quand il s'est agi de l'utilisation des substances ternaires. Avec l'albumine ou la gélatine employées seules il y a formation d'une grande quantité d'oxalate d'ammonium, à laquelle correspond une abondante fixation d'oxygène, ce qui contribue à expliquer la faible valeur du quotient respiratoire.

Nous avons déjà eu l'occasion de signaler le fait que chez les plantes supérieures l'asparagine, qui apparaît en quantité considérable lors de la digestion des substances protéiques, n'est qu'un produit secondaire ; elle dérive, comme la glutamine, des acides aminés proprement dits par un phénomène d'oxydation ; une molécule d'acide aminé aboutit à la formation d'ammoniaque déterminant une amidation d'une autre molécule d'acide aminé, pour aboutir en fin de compte, à la production d'asparagine.

Nous avons vu que la formation d'asparagine néces-

site la présence d'une certaine quantité de sucre ; si celui-ci vient à faire défaut, l'ammoniaque qui est le dernier produit de la transformation des protéines s'accumule dans les cellules et détermine une intoxication ; la même chose arrive chez les animaux ; mais, alors que ceux-ci éliminent l'ammoniaque sous forme d'urée, les plantes ne peuvent la faire disparaître qu'en fabriquant de l'asparagine, substance inoffensive, qui peut même à son tour être utilisée pour la production de nouvelles substances protéiques.

Réduction des azotates par les plantes. — Il a été fait précédemment allusion à l'intervention des azotates dans les échanges gazeux que présentent les plantes vertes ; l'oxygène supplémentaire qui se dégage dans une enceinte où un végétal chlorophyllien se développe en présence d'un nitrate est, au moins en majeure partie, imputable à la réduction de cette dernière substance.

Il est facile de mettre le phénomène en évidence en cultivant une plante telle que le Radis sur des milieux minéraux et glucosés ne différant que par la nature de la source azotée, constituée dans un cas par du chlorure d'ammonium, dans un autre par du nitrate de potassium ; si les tubes dans lesquels on effectue ces cultures sont entièrement fermés on constate, à l'aide d'un manomètre latéral, qu'il se produit une augmentation de pression beaucoup plus considérable en présence du nitrate et l'analyse de l'atmosphère, à la fin de l'expérience, montre que c'est bien à un excès d'oxygène qu'est dû le phénomène.

J'ai obtenu des résultats tout à fait de même ordre

avec plusieurs substances azotées telles que l'urate de sodium, l'urée, l'asparagine, le glycocolle, la peptone, fournies comme aliments azotés à une Algue verte, le *Stichococcus bacillaris*, en présence des substances minérales indispensables et de glucose ; ces substances déterminent toutes, pour des cultures effectuées à la lumière, un dégagement supplémentaire d'oxygène ; ce dégagement est décroissant, pour les diverses substances qui viennent d'être envisagées, suivant l'ordre dans lequel elles viennent d'être énumérées ; l'urate de sodium en particulier donne lieu à un dégagement d'oxygène de même ordre que celui qui est obtenu avec l'azotate de potassium, bien qu'un peu plus faible.

Mais, si on vient à comparer les volumes d'oxygène supplémentaire ainsi dégagé à ceux qui sont contenus dans les substances azotées introduites dans la culture, on constate que les premiers sont toujours inférieurs aux seconds, pour une durée suffisante du développement ; il ne s'est donc pas produit une simple réduction des substances azotées ; mais celles-ci se sont comportées d'une manière catalytique.

On retrouve une action catalytique de même ordre, de la part des azotates en particulier, en ce qui concerne la respiration des êtres hétérotrophes ou la fermentation alcoolique ; le quotient respiratoire se trouve augmenter et l'intensité de la fermentation alcoolique s'accroît ; c'est du reste ce gaz carbonique supplémentaire qui a été décomposé à la lumière, dans l'expérience précédente, par l'assimilation chlorophyllienne et qui s'est retrouvé à l'état d'oxygène libre. Ici encore la quantité de gaz carbonique dégagé en excès contient une quantité d'oxygène qui peut être beaucoup plus

considérable que celle qui correspond à la masse de nitrate introduit dans le milieu de culture.

Un autre exemple d'intervention des substances azotées dans un phénomène étudié à propos des substances ternaires nous sera fourni par la fermentation alcoolique.

2. Rôle des substances azotées dans la production de substances accessoires de la fermentation alcoolique

Nous avons étudié ailleurs la fermentation alcoolique qui consiste en une décomposition de certains sucres, aboutissant essentiellement à la formation de gaz carbonique et d'alcool éthylique. Mais il apparaît, à côté de ces substances nettement prédominantes, une série de corps accessoires ; deux de ceux-ci, l'huile de fusel et l'acide succinique, nous offrent des exemples intéressants de l'intervention des substances azotées dans le phénomène complexe de la fermentation alcoolique, montrant ainsi que les substances ternaires et les substances azotées sont intimement liées dans les processus généraux du métabolisme des végétaux.

L'huile de fusel est surtout constituée par un mélange d'alcool isoamylique $(CH^3)^2 = CH - CH^2 - CH^2OH$ et d'alcool d. amylique actif $\begin{matrix} CH^3 \\ C^2H^5 \end{matrix}\!\!>\!CH-CH^2OH$.

On a tout d'abord rapporté son origine au sucre mis à la disposition de la Levure ; mais F. Ehrlich a réussi à démontrer que les substances en question proviennent d'acides aminés provenant de la décomposition

des matières protéiques des organismes qui provoquent la fermentation.

Au point de vue purement chimique il existe une étroite analogie entre la l. leucine $(CH^3)^2 = CH - CH^2 - CH\begin{cases}CO^2H\\AzH^2\end{cases}$ et l'alcool isoamylique, ainsi qu'entre l'isoleucine $\begin{matrix}CH^3\\C^2H^5\end{matrix}\!\!>\!CH - CH\begin{cases}CO^2H\\AzH^2\end{cases}$ et l'alcool amylique droit.

Or, si on vient à introduire dans une culture pure de Levure l'un de ces acides aminés, on obtient précisément l'alcool amylique correspondant.

La réaction est la suivante en ce qui concerne la leucine :

$$(CH^3)^2 = CH - CH^2 - CH\begin{cases}COOH\\AzH^2\end{cases} + H^2O =$$
$$(CH^3)^2 = CH - CH^2 - CH^2OH + CO^2 + AzH^3$$
alcool isoamylique

Les quantités d'alcools ainsi produits se trouvent être proportionnelles aux quantités d'acides aminés introduits et correspondent à un rendement d'environ 80 p. 100 du rendement théorique.

D'ailleurs d'autres acides aminés peuvent également subir une transformation analogue sous l'influence de la Levure ; c'est le cas de la tyrosine ainsi que de la phénylalanine ; avec cette dernière substance $C^6H^4.OH - CH^2 - CH\begin{cases}COOH\\AzH^2\end{cases}$ on aboutit ainsi à l'alcool phényléthylique $C^6H^5 - CH^2 - CH^2OH$ qui est le principal constituant de l'essence de rose.

Ces faits permettent de comprendre que la nature des produits accessoires est sous la dépendance de celle des substances protéiques qui accompagnent les matières subissant la fermentation alcoolique.

Ehrlich a également montré qu'il faut attribuer une origine analogue à l'acide succinique COOH — CH^2 — CH^2 — COOH qui apparaît dans la fermentation alcoolique ; il s'agit ici de l'oxydation de l'acide glutamique résultant de la décomposition des protéines de la levure ; on aurait

$$\underset{\text{ac. glutamique}}{COOH - CH^2 - CH^2 - CH\begin{matrix}COOH\\AzH^2\end{matrix}} + O^2 =$$

$$\underset{\text{ac. succinique}}{COOH - CH^2 - CH^2 - COOH} + AzH^3 + CO^2$$

Ces diverses réactions ne sont pas, en somme, autre chose que des cas particuliers de fermentations portant sur des substances azotées, phénomènes qu'il nous faut maintenant envisager dans leur ensemble.

3. Fermentation des substances azotées

On entend par le terme de fermentation toute transformation d'une substance organique s'opérant par l'intervention de cellules végétales, correspondant à un ensemble varié de réactions chimiques, hydratations, oxydations, réductions, et apparaissant comme une source d'énergie pour l'être qui la produit.

Les matières protéiques abandonnées à elles-mêmes dans des conditions convenables d'humidité et de température, subissent, du fait de l'intervention de nombreux microorganismes, un ensemble très com-

plexe de transformations successives, constituant la *fermentation putride*, et amenant une dislocation de plus en plus profonde de leurs molécules ; on peut y reconnaître une série de phases, chacune préparant la suivante, et à chaque degré de désagrégation interviennent souvent des organismes spéciaux. Ceux-ci sont ou bien des Champignons tels que des *Mucor*, des *Aspergillus*, des *Fusarium*, ou bien et surtout des Bactéries dont les unes sont aérobies (*Proteus vulgaris*, *Micrococcus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus fluorescens liquefaciens*...), les autres anaérobies (*Bac. putrificus*, *Proteobacter*...).

A. Putréfaction des substances protéiques

Plusieurs des substances qui se constituent lors de la décomposition bactérienne des matières protéiques se rencontrent dans les digestions tryptiques ; c'est le cas des acides monoaminés (leucine, tyrosine) et des protéoses. Mais il en apparaît d'autres dans le phénomène de putréfaction qu'on ne rencontre jamais dans les digestions tryptiques ; ce sont par exemple l'indol, le scatol, le méthylmercaptan (alcool sulfuré $H.CH^2SH$), l'acide sulfhydrique, l'hydrogène phosphoré, l'ammoniaque, le gaz carbonique, le méthane, des acides gras de la série acétique, enfin des phénols et des acides aromatiques. Par contre ces composés rappellent ceux qui se constituent sous l'action de la lessive de potasse bouillante sur les protéines ; l'indol et le scatol apparaissent en particulier dans ces conditions. Il est vraisemblable qu'à la putréfaction correspond une série de diastases spéciales, dont la

trypsine serait la première à intervenir et qui ne sont d'ailleurs pas connues ; elles détermineraient la formation d'ammoniaque, le dégagement d'acide carbonique qui peut représenter les 97 centièmes du volume gazeux total dégagé, et une série d'oxydations et de réductions.

Les bactéries aérobies produisent une combustion relativement complète qui aboutit à la formation d'eau, de gaz carbonique et d'ammoniaque ; les bactéries anaérobies donnent naissance de leur côté à des acides gras, de l'hydrogène, du méthane et de l'acide sulfhydrique.

C'est par oxydation qu'apparaîtraient les composés phénoliques et la tyrosine serait leur principale origine.

Nous avons dit que l'indol et le scatol dérivent du noyau tryptophane ; il s'en produit dans les cultures de nombreuses bactéries (*Bacillus coli*, *Proteus vulgaris*, *Bac. pyocyaneus*...) ; on le reconnaît facilement à la coloration rouge qui se produit sous l'action de l'acide nitrique et à la coloration violette qui est réalisée en présence de ferricyanure de sodium et de soude.

L'acide sulfhydrique, produit également par beaucoup de bactéries, provient du noyau cystine ; enfin le méthylmercaptan se reconnaît aisément par la coloration verte qu'il donne en présence d'isatine (solution sodique à 0,5 p. 100).

B. Fermentation ammoniacale ; ammonisation

Certaines bactéries transforment jusqu'à 46 p. 100 de l'azote des matières protéiques en ammoniaque

(*Bac. mycoides*) et paraissent agir sur les acides aminés ; on aurait par exemple

$$\underset{\text{Glycocolle}}{CH^2.AzH^2 - CO^2H} + H^2O = AzH^3 + \underset{\text{Ac. glycolique}}{CH^2OH - CO^2H}$$

sans d'ailleurs qu'on ait pu mettre en évidence l'existence d'un tel acide-alcool, qui serait de suite transformé en acide gras correspondant par un phénomène de réduction

$$CH^2OH - CO^2H = O + CH^3.CO^2H$$

On rencontre en effet de tels acides (acétique, propionique, butyrique, caproïque) dans ces circonstances.

On peut se rendre compte par une expérience facile de la production d'ammoniaque dans la terre aux dépens des matières organiques ; il suffit de mélanger dans un vase de la terre ordinaire avec des feuilles sèches par exemple et d'arroser convenablement ; en été on perçoit, au bout de trois ou quatre jours, une odeur très nette d'ammoniaque ; si la terre et les substances organiques ont été stérilisées au préalable par une température de 120° il ne se produit rien de tel, ce qui montre bien que ce sont des microorganismes qui interviennent.

Cette ammonisation du sol apparaît comme résultant de l'action d'un très grand nombre de Bactéries et de Champignons (*Mucor racemosus, Aspergillus, Fusarium Müntzii*) ; comme cela est habituel les Bactéries agissent surtout dans les sols à réaction alcaline (c'est le cas de terres cultivées d'une manière intense), les Champignons au contraire interviennent surtout dans les sols acides, tels que ceux des forêts ;

donnons ici les résultats obtenus par Müntz avec le *Mucor racemosus* et le *Fusarium Muntzii* agissant sur du sang desséché ajouté dans la proportion de 1 p. 100 à de la terre stérilisée, puis ensemencé avec les deux Champignons en question ; les quantités d'ammoniaque formée au bout de soixante-dix jours étaient, par 100 grammes de terre :

Terre non ensemencée.		0
Terre ensemencée avec	*Mucor racemosus* . .	27 mgr. 2
	Fusarium Müntzii. .	19 — 2

Fermentation ammoniacale de l'urée. — Parmi les nombreuses fermentations aboutissant à la formation d'ammoniaque l'une des mieux étudiées est celle qui correspond à la transformation de l'urée ; elle se produit dans le fumier et elle est facile à reconnaître avec l'urine.

L'urine de l'homme et des carnivores est limpide et acide ; exposée à l'air elle ne tarde pas à se troubler et sa réaction devient alcaline ; il se forme un dépôt constitué par des phosphates et diverses matières organiques ; dans ce dépôt Pasteur a reconnu l'existence d'une bactérie, le *Micrococcus ureæ* (fig. 45), étudié par Van Tieghem. L'urée est transformée par cette bactérie en carbonate d'ammoniaque suivant un phénomène d'hydratation :

$$CO(AzH^2)^2 + 2\,H^2O = CO^3(AzH^4)^2$$

Mais il existe toute une série d'autres organismes, dans l'air ou le sol, capable d'opérer cette transformation ; ce sont des bacilles, des coccus, des sarcines, des urobacilles (*Ur. Pasteuri*) (fig. 46), des moisis-

sures ; dans les eaux d'égout il existe environ 50 ferments de l'urée sur 1.000 microbes. On peut les isoler facilement à l'aide d'un bouillon peptonisé gélatiné, auquel on ajoute de 2 à 5 p. 100 d'urée; en vingt-quatre heures on a des colonies qui s'entourent fréquemment d'une auréole caractéristique, formée de phosphate et de carbonate de calcium.

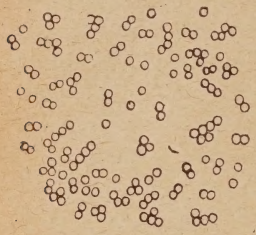


Fig. 45.
Micrococcus ureæ.

Ces divers organismes transforment aussi l'acide hippurique des herbivores suivant la formule

$$C^6H^5—CO—CHAzH^2—CO^2H + H^2O = C^6H^5—CO^2H + CH^2.AzH^2—CO^2H$$
Ac. benzoïque — Glycocolle

puis il y a formation d'ammoniaque à partir du glycocolle.

L'acide urique est également transformé en urée, puis en ammoniaque :

$$C^5Az^4H^4O^3 + 2\,H^2O + O^3 = 2\,CO(AzH^2)^2 + 3CO^2$$
Ac. urique — Urée

Mais cette transformation ne s'effectue pas par l'intervention du *Micrococcus ureæ* ; il s'agit d'un autre organisme, isolé par Ulpiani et qui, en produisant de l'urée, prépare l'action du *M. ureæ*, étant lui-même incapable d'agir sur l'urée.

De la même manière on a reconnu qu'il existe dans le guano du Pérou une bactérie capable de transformer la guanine en urée.

Tous ces microbes agissent par une diastase telle que l'*uréase*, qui a été isolée par Miquel ; il suffit, pour l'obtenir de cultiver à 35° le *Micrococcus ureæ* dans un vase à toxine, avec un large contact avec l'air, et de filtrer à la bougie. On peut encore mettre en évi

Fig. 46. — *Urobacillus Pasteuri.*

dence l'action diastasique en tuant la bactérie par le chloroforme et montrant que le liquide de culture agit encore sur l'urée en solution rendue aseptique par l'addition du thymol. De nombreux Champignons, tels que le *Boletus edulis*, contiennent de l'uréase.

Nemec a montré que c'est par une autre diastase, l'*uricase*, que l'acide urique est transformé en urée.

On retrouve de telles diastases dans les plantes supérieures ; on a pu extraire l'uréase des graines de Soja (Takenchi) et la reconnaître dans les graines de Ricin et de Céréales ; la présence de l'uréase et de l'uricase (racine de Haricot) explique l'utilisation de l'urée et de l'acide urique par les végétaux ; c'est l'ammoniaque dérivant de la transformation de ces substances qui se trouve utilisée en fin de compte.

Il existe dans les terres arables une substance noire particulière, que nous avons désignée sous le nom d'humus et qui est le résultat d'une transformation déjà avancée de substances organiques ; elle contient de l'azote sous une forme qui est capable de se transformer en ammoniaque. Si on traite de la terre végétale par un acide tel que l'acide chlorhydrique, on constate qu'il se forme de l'ammoniaque ; il en est de même avec les alcalis ; cela donne à penser que nous sommes en présence d'azote à l'état amidé, comme nous l'avons vu à propos de l'asparagine ; ce serait encore cet azote amidé qui, sous l'action des êtres vivants, donnerait naissance à de l'ammoniaque, mais d'une manière plus lente. On a signalé que le chaulage des terres favorisait cette production et il est logique de penser que la chaux intervient ici en tant qu'alcali.

Les substances amidées peuvent subir une transformation en ammoniaque par une simple hydratation, comme nous l'avons mis en évidence pour le cas de l'urée ; il n'y a donc pas dans ce cas intervention de l'oxygène ; il n'en est plus de même pour tous les

corps organiques de la forme $R.AzH^2$ qui contiennent de l'azote à l'état aminé ; il est alors nécessaire qu'il s'effectue une oxydation du carbone et de l'hydrogène du radical correspondant R, aboutissant à la formation de gaz carbonique et d'eau ; si on considère par exemple le monométhylamine $CH^3.AzH^2$ on aurait

$$CH^3.AzH^2 + O^3 = CO^2 + H^2O + AzH^3$$

C'est en fait une réaction qui se produit dans le sol où, à côté des substances amidées que nous avons signalées, existent des substances aminées (acides aminés ou amines) provenant de la fermentation des matières organiques complexes. Demoussy (1898) a montré que la terre végétale renfermait des ferments capables d'assurer la transformation de l'azote aminé en azote ammoniacal en introduisant dans des ballons de culture 0 gr. 01 de sulfate de monométhylamine avec 100 grammes d'eau, 1 gramme de carbonate de calcium et 0 gr. 01 de phosphate bipotassique ; le liquide stérilisé est ensemencé avec un peu de terre ; on constate la disparition de l'amine et la formation d'ammoniaque, cette transformation apparaissant comme liée à la présence de l'oxygène de l'air.

La transformation des amines en ammoniaque est d'autant plus lente que la molécule correspondante est plus complexe, raison à laquelle vient s'ajouter d'ailleurs la toxicité plus considérable vis-à-vis des bactéries agissantes.

L'ammoniaque peut du reste se produire dans le sol par des procédés variés ; c'est ainsi qu'on a pu montrer que certains organismes, tels que le *Bacillus subtilis* et le *B. mycoides*, sont capables, en présence de

l'air, d'oxyder les matières organiques et de produire du gaz carbonique, de l'acide sulfurique et de l'ammoniaque, ou, à l'abri de l'oxygène et dans un sol contenant des nitrates, de réduire ces derniers en nitrites, puis en ammoniaque ; nous sommes alors en présence d'un mode de production d'ammoniaque que nous étudierons spécialement plus loin sous le nom de dénitrification. L'ammoniaque peut donc être produite par un même organisme par deux voies différentes.

C. Dégagement d'azote gazeux dans la fermentation des matières azotées

Tout l'azote des substances organiques qui subissent la fermentation putride n'est pas transformé forcément en ammoniaque et on a observé par exemple pour le fumier un dégagement d'azote gazeux ; on conçoit l'importance pratique de ce phénomène puisqu'il se traduit par une perte d'azote pour le sol et les végétaux qui s'y développent. Il dépend d'ailleurs de la nature des fermentations qui président à la transformation des matières organiques ; c'est ainsi que, d'après les recherches de Dehérain et Dupont, du fumier abandonné à une fermentation aérobie donne naissance à de l'ammoniaque et à un dégagement d'azote libre correspondant à 13 p. 100 de l'azote organique primitif ; le même fumier, en fermentation anaérobie, ne produit que de l'ammoniaque, sans perte d'azote gazeux ; on voit de suite les conséquences qui découlent de cette constatation en ce qui concerne la manière dont doit être traité le fumier ; c'est au

souci d'éviter une perte d'azote libre que correspond la pratique consistant à arroser le fumier avec du purin qui provoque une abondante fermentation forménique anaérobie.

La question s'est posée, à propos des plantes supérieures, de savoir si elles ne pouvaient pas elles aussi être le siège d'un dégagement d'azote libre, et c'est surtout à propos du phénomène de la germination que des expériences ont été réalisées à ce sujet; on a observé en effet que la plantule contenait une quantité d'azote total un peu plus faible que l'amande lorsqu'on ne fournit aucune source d'azote extérieure à la graine; WILFARTH, RÖSSER, WIMMER ont conclu qu'effectivement cette perte d'azote correspondait à un dégagement gazeux; BOUSSINGAULT, LAWES et GILBERT, HELLRIEGEL n'ont au contraire pas réussi à mettre le phénomène en évidence.

Récemment DAVIDSON le rapporte, quand il existe, à l'activité de microorganismes existant à la surface de la graine; il s'agit toujours d'ailleurs, d'un dégagement d'azote libre de très faible intensité et il fait toujours défaut lorsqu'on opère avec des graines strictement stérilisées.

Engrais organiques. — Ce que nous venons d'apprendre sur la transformation des matières azotées complexes sous l'action des microorganismes permet de comprendre comment celles-ci, aboutissant à la formation d'ammoniaque, se comportent comme des engrais vis-à-vis des végétaux supérieurs; elles constituent en somme une source indirecte de composés ammoniacaux; nous ne ferons que rappeler l'usage

qui a été fait de tout temps en agriculture du fumier qui agit à la fois chimiquement comme aliment et physiquement en augmentant la porosité du sol; il n'est d'autre part pas seulement une source d'azote, mais il restitue encore à la terre tous les éléments entrant dans la constitution des plantes et des animaux dont il dérive.

La transformation du fumier est assez rapide dans le sol, mais certaines matières organiques ne sont transformées que d'une manière très lente; c'est le cas par exemple de la corne qui se comporte comme une source d'azote durable et dont on a proposé l'emploi en horticulture.

On a récemment proposé comme engrais azoté la cyanamide de calcium correspondant à la formule CAz.AzCa ; cette substance permet la fixation indirecte de l'azote de l'air et son utilisation par les végétaux. On l'obtient en faisant réagir au four électrique le carbure de calcium sur l'azote :

$$CaC^2 + Az^2 = Ca.CAz^2 + C$$

Il paraît du reste se comporter comme un engrais inférieur au sulfate et à l'azotate d'ammonium. Il existe d'ailleurs de grandes divergences dans les résultats fournis par les différents essais et il semble bien que la valeur nutritive de la cyanamide de calcium varie beaucoup avec la nature du sol et les diverses conditions de l'expérience; c'est que la manière dont elle est transformée dépend essentiellement de la composition chimique du sol et de sa flore bactérienne, et c'est pour cette dernière raison que nous signalons à cette place l'existence de cet engrais spécial.

Quand on met la cyanamide de calcium en présence d'eau froide on obtient de l'ammoniaque et du carbonate de calcium

$$CAz.AzCa + 3\,H^2O = 2\,AzH^3 + CO^3Ca$$

Dans le sol, en présence d'eau et de gaz carbonique on a

$$\underset{\text{cyanamide}}{CAz.AzCa} + CO^2 = CAz.AzH^2 + CO^3Ca$$

il se forme de la cyanamide qui se comporte comme une substance toxique. Mais toute une série de bactéries peuvent empêcher cette dernière action en donnant naissance à des composés ammoniacaux, avec apparition d'urée comme substance intermédiaire :

$$CAz.AzH^2 + H^2O = CO(AzH^2)^2$$

L'utilisation de la cyanamide de calcium est donc liée d'une manière très étroite à la flore microbienne du sol et c'est surtout dans les terres riches en bactéries que son usage est à recommander; elle peut au contraire se montrer nuisible dans les sols stériles; on a pour la même raison recommandé d'ajouter à la cyanamide de calcium du fumier qui agit surtout en apportant les bactéries utiles.

D. Nitrification

Mais nous avons vu que c'est surtout sous la forme de nitrates que l'azote est assimilé par les plantes supérieures dans les conditions naturelles, et l'étude de la manière dont se constituent ces sels présente un haut intérêt. On connaît depuis longtemps la pro-

duction de salpêtre, mélange de nitrate de potassium et de nitrate de calcium, sur les murs des étables, des caves, et on a pu établir les meilleures conditions de son apparition ; la présence de matières organiques, une bonne aération, une humidité convenable, entretenue par exemple à l'aide d'arrosages à l'urine, la présence de potassium et de calcium constituent autant de facteurs essentiels.

Tous les sols contiennent d'ailleurs une quantité plus ou moins considérable de nitrates ; elle varie pour les sols forestiers et agricoles dans des proportions considérables ; pour des terres prises sur une épaisseur de 33 centimètres à partir de la surface, on trouve à l'hectare de 2 kgs 3 à 356 kilos de nitrate (évalué en nitrate de potassium) et l'apport par les eaux de pluie ne suffit pas pour expliquer de telles quantités de sels azotés.

Un litre de pluie contient, dans nos contrées, de 1 à 6 milligrammes d'acide azotique, quelquefois moins ; cette quantité ne paraît pas être beaucoup plus considérable lors des temps orageux et les faibles décharges électriques qui existent toujours dans l'atmosphère paraissent suffire à la formation de l'acide nitrique ; dans les pays tropicaux la teneur de la pluie en acide nitrique est souvent beaucoup plus élevée ; Müntz et Marcano ont trouvé jusqu'à 16 milligrammes de cet acide dans les eaux de pluie de Caracas ; en tenant compte de cette teneur et connaissant la quantité de pluie tombée sur un sol donné, on n'arrive jamais à expliquer la teneur de ce dernier en azotates.

On a tout d'abord cherché à expliquer, au moins partiellement, le phénomène de la nitrification dans

le sol par une combinaison de l'azote et de l'oxygène de l'air s'opérant sous l'influence catalytique de corps poreux ; la nitrification était dans cette hypothèse considérée comme un phénomène d'enrichissement du sol en azote assimilable ; les études ultérieures ont montré qu'il s'agit d'une simple transformation.

Boussingault a le premier montré que l'azote de l'air n'intervient pas directement dans le phénomène. Il introduisait dans des ballons de 10 litres un mélange d'environ 100 grammes de terre végétale et 300 grammes de sable quartzeux lavé, calciné et légèrement humecté d'eau distillée, bien exempte d'ammoniaque ; ce sable était destiné à rendre le mélange perméable ; les ballons, fermés en 1860, furent ouverts en 1871 ; les résultats obtenus relativement aux quantités d'azote total, d'azote nitrique et de carbone mesurées dans la terre au début et à la fin de l'expérience sont les suivants :

	Azote total	Azote nitrique	Carbone
1860	0 gr. 472	0 gr. 00075	3 gr. 663
1871	0 — 452	0 — 160	3 — 067
Différences.	— 0 gr. 020	+ 0 gr. 160	— 0 gr. 596

Dans une autre expérience où avaient été ajoutés 5 grammes de cellulose les résultats ont été de même ordre :

	Azote total	Azote nitrique	Carbone
1860	0 gr. 472	0 gr. 00075	5 gr. 885
1871	0 — 464	0 — 14570	3 — 358
Différences.	— 0 gr. 008	+ 0 gr. 145	— 2 gr. 527

Il y avait donc eu formation d'acide azotique sans

que la teneur en azote total ait subi d'augmentation : *l'azote de l'air n'intervenait donc pas dans le phénomène de la nitrification.*

Boussingault fit une série d'autres expériences destinées à faire la part qui revient dans le phénomène aux différents constituants de la terre végétale ; il mélangea certaines matières organiques azotées (paille, tourteau de colza, sang desséché...) à des terres qui étaient soit du sable, soit de la craie, soit enfin de la terre végétale et prit comme témoins ces derniers milieux sans leur ajouter de substance organique. Au bout de cinq ans on constatait qu'il n'y avait eu de nitrification appréciable que dans les milieux constitués par du sable ou de la craie mélangés à une matière organique ou dans la terre végétable seule ; cette dernière apparaissait donc comme le seul milieu spontanément nitrifiable.

Conditions de la nitrification. — Schloesing (1873) étudia ensuite les conditions du phénomène et il reconnut qu'elles étaient au nombre de cinq.

1° Il faut qu'il existe *une matière organique azotée ;* cette substance était introduite à l'état naturel et il ne pouvait être question, à l'époque où ont été faites les expériences relatées, de précaution d'aseptie.

Si on ajoutait par exemple à de la terre des quantités croissantes de terreau, les quantités d'acide nitrique formé se montraient comme proportionnelles au poids de la matière organique introduite. Le rendement variait d'ailleurs avec la nature de la substance organique sur laquelle on expérimentait.

2° L'*oxygène* est absolument nécessaire ; en présence

d'atmosphères constituées par des mélanges d'oxygène et d'azote en proportions variées les quantités d'acide nitrique formé par kilo de terre en quatre mois étaient les suivantes :

Teneur en oxygène p. 100 . .	1,5	6	11	16	21
Acide nitrique formé (mgr.). .	46	96	131	162	246

L'acide nitrique augmente donc très nettement avec la quantité d'oxygène.

Lorsque la terre est abandonnée dans de l'azote pur non seulement l'acide nitrique ne se forme plus, mais celui qui existait au début de l'expérience disparaît ; c'est ainsi que dans une expérience faite avec de la terre qui contenait au début 64 milligrammes d'acide nitrique, il n'existait plus trace de cette substance neuf mois après la suppression de l'oxygène, l'air étant remplacé par de l'azote pur ; nous aurons l'occasion de revenir sur ce phénomène, inverse de de celui de la nitrification.

3° La présence d'*une base* est nécessaire. Boussingault avait déjà montré que les carbonates alcalins, calcaires ou magnésiens étaient indispensables ; Schlœsing établit que c'est le bicarbonate de calcium qui est le plus efficace ; il en suffit d'ailleurs de très faibles quantités, au delà desquelles le phénomène n'augmente plus ; lorsqu'on fait passer dans les vases contenant la terre sur laquelle on expérimente un courant d'air contenant des quantités variables de gaz carbonique on obtient les rendements suivants en acide nitrique au bout de deux mois :

CO^2 p. 100	0	1,3	3,5	9
Acide nitrique formé (mgr.) par kg. de terre.	186	248	247	251

Avec la teneur de 1,3 p. 100 en gaz carbonique on augmente sensiblement le rendement, mais celui-ci reste constant pour des teneurs plus grandes.

4° Le phénomène de la nitrification dépend de la *quantité d'eau* que contient la terre ; on obtient, au bout d'un mois, les rendements qui suivent pour diverses teneurs en eau :

Eau p. 100 de terre	9	15	20
Acide nitrique formé (mgr.) par kg. de terre.	157	397	478

Il y a donc augmentation très appréciable d'acide nitrique formé lorsque la teneur en eau s'accroît ; mais il existe une teneur d'eau optima qui est sensiblement celle de 20 p. 100.

5° La *température* intervient également, comme il est facile de le prévoir ; à 5° et à 57° la nitrification est nulle ; entre ces deux températures extrêmes il existe un optimum qui correspond à 37°.

Cause de la nitrification. — Provoquées par les découvertes de Pasteur les expériences de Schlœsing et Müntz (1877) ont eu pour but de rechercher la cause du phénomène de la nitrification et comme résultat de montrer qu'il est dû à l'intervention de microorganismes. Ces expériences portèrent sur les eaux d'égouts dont on étudiait alors l'épuration.

Dans un large tube, long de un mètre, fermé à sa partie inférieure par une toile métallique, il était introduit 5 kilos de sable quartzeux calciné au rouge et mélangé à 100 grammes de craie pulvérisée ; on versait goutte à goutte des eaux d'égout dans ce tube de manière à ce que la descente s'effectuât en huit

jours. Dans les vingt premiers jours il n'apparut pas trace d'acide azotique ; l'ammoniaque apparaissait au contraire en quantité croissante; puis de l'acide azotique se produisit en même temps qu'on constatait une diminution de l'azote organique et de l'azote ammoniacal ; s'il s'était agi d'une simple oxydation à l'air il est bien évident qu'elle se serait produite dès le début. Si d'autre part on venait à faire circuler des vapeurs de chloroforme dans le tube, la production d'acide nitrique cessait, l'ammoniaque réapparaissait au contraire ; ces deux faits plaident déjà en faveur de l'intervention de microorganismes.

Celle-ci est rendue manifeste par des ensemencements opérés sur des liquides ammoniacaux préalablement stérilisés par la chaleur (eaux d'égout, milieux liquides artificiels à base de sels ammoniacaux...) ; si on y introduit une trace de terreau, d'eau d'égout ou même d'eau courante le phénomème de la nitrification apparaît et on peut le faire cesser en portant les liquides à 70°.

On peut également démontrer l'intervention de microbes dans le phénomène de la nitrification en répétant l'expérience initiale de Boussingault avec de la terre additionnée d'une substance organique azotée, telle que du sang desséché, et portée pendant un temps suffisant à la température de 100° dans une autoclave ; au bout d'un mois ou deux on constate que la teneur en nitrate n'a pas subi de modification ; mais il n'en est plus de même si on vient à ajouter à la masse stérilisée un peu de terre qui se trouve apporter les organismes indispensables à la production d'acide nitrique ; celle-ci a lieu en

effet, à partir de ce moment, d'une manière très appréciable.

Schlœsing et Müntz montrèrent que cette faculté n'appartient pas à des espèces banales (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*...) qui se trouvent au contraire détruire les nitrates, mais qu'il s'agit d'êtres ayant une propriété spécifique.

Les conclusions de ce travail furent confirmées par un grand nombre d'expérimentateurs et particulièrement par Warington (1879) ; celui-ci insista sur un fait déjà signalé par Schlœsing et Müntz et consistant dans la formation d'acide nitreux au cours de ces expériences, en particulier lorsque les solutions sont relativement concentrées et exposées à une température assez élevée ; les savants français avaient regardé cette production comme le résultat d'une fermentation nitrique entravée par le manque d'oxygène ; nous aurons bientôt l'explication de ce phénomène.

D'autre part il fut établi que la nitrification ne nécessitait que de véritables traces de matière carbonée ; Heroeus (1886) montra même que les bactéries capables de déterminer la formation de l'acide nitrique aux dépens de l'ammoniaque agissaient d'une manière beaucoup plus intense dans un milieu exclusivement minéral que dans le même milieu additionné de glucose ; on se trouvait en présence d'un phénomène parodoxal ; ce fut à Winogradsky (1890-92) que revint le mérite d'isoler les microorganismes de la nitrification et d'en préciser les propriétés en cultures pures.

Isolement des bactéries de la dénitrification. — Les

échecs subis par les savants qui avaient antérieurement cherché à isoler les organismes de la nitrification tenaient à ce qu'ils se servaient toujours dans leurs essais de milieux nutritifs à base de gélatine, qui sont utilisés si couramment en bactériologie et qui offrent le double avantage de devenir solides à la température ordinaire et de constituer un milieu nutritif ordinairement favorable au développement des bactéries.

Winogradsky réussit à isoler les organismes de la nitrification en réalisant tout d'abord cette fermentation dans des liquides exclusivement minéraux et en s'appuyant, pour effectuer la séparation des germes, sur la propriété qu'ils possèdent de se développer le mieux en l'absence de matières organiques. Le savant russe effectua tout d'abord des ensemencements d'une goutte de liquide en pleine nitrification dans une solution minérale telle que la suivante :

Eau	1000
Sulfate d'ammonium	1
Phosphate dipotassique	1

On en prenait 100 centimètres cubes qu'on introduisait dans un matras et on ajoutait de 0 gr. 5 à 1 gramme de carbonate de magnésium.

C'est également avec des solutions minérales que Boullanger et Massol ont obtenu une nitrification relativement rapide des substances ammoniacales en cultures artificielles par l'emploi de petits tonnelets de verre remplis de scories, qui permettent l'établissement d'une large surface d'aération ; on verse dans ces récipients de 2 litres le liquide à nitrifier jusqu'au

tiers du volume des vases ; ce liquide est celui de Winogradsky ou celui qui a été proposé par Omeliansky et qui est ainsi composé :

Eau	1000
Sulfate d'ammonium	2
Chlorure de sodium	2
Phosphate dipotassique	1
Sulfate de magnésium	0,5
— de fer	0,4

On stérilise, puis on ajoute dans chaque tonnelet 0 gr. 5 de carbonate de magnésium sous forme de lait lui-même stérilisé. On ensemence ensuite et on fait passer un courant d'air stérile et lent ; de temps en temps on fait subir au vase une rotation autour de son axe horizontal, de manière à mettre le liquide en contact avec une nouvelle portion de scories. On peut de la sorte obtenir en cinquante-quatre jours 11 grammes de nitrate par litre ; les scories servent de support aux organismes actifs et on se trouve opérer d'une manière analogue à celle qui est réalisée dans certains procédés employés pour la fabrication du vinaigre.

Winogradsky réussit à isoler cinq espèces de bactéries susceptibles de se développer sur des milieux gélatinés ; mais aucune d'elles n'était capable de reproduire le phénomène de la nitrification ; le procédé d'isolement ne convenait donc pas en l'espèce. D'autre part l'auteur observa au fond des vases de culture, alors que la nitrification était active, une couche trouble qui, dans les cultures anciennes, se transformait en une sorte de zooglée floconneuse, emprisonnant les particules de carbonate de magnésium.

Pour isoler les bactéries qui donnaient naissance à

cette production, WINOGRADSKY fit une prise de ces grumeaux et les introduisit dans de l'eau stérilisée ; il les ensemençait ensuite dans un milieu gélatiné et reprenait ceux qui ne donnaient naissance à aucun développement ; il les reportait enfin dans des milieux minéraux stérilisés et obtenait ainsi des cultures capables de provoquer une nitrification très régulière ; ainsi se trouvait réalisée une séparation des bactéries actives.

WINOGRADSKY a pu isoler du premier coup les bactéries de la nitrification en ensemençant un peu de terre sur un milieu exclusivement minéral, rendu solide par l'addition de silice gélatineuse et ayant la composition qui suit :

Eau	1000
Sulfate d'ammonium	0,4
— de magnésium	0,5
Phosphate dipotassique	1
Carbonate de sodium	6
Chlorure de calcium	traces

La préparation de la silice gélatineuse exige certaines précautions qui ont été indiquées par OMELIANSKY ; on verse lentement dans 125 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 13° B un volume égal d'une solution de silicate de potassium à 8° B et on soumet le mélange à la dialyse ; pour éviter une coagulation prématurée de la silice, il est nécessaire de débarrasser, par un lavage à l'acide chlorhydrique et à l'eau distillée, le parchemin animal dont on se sert de la chaux qu'il peut contenir et d'effectuer la dialyse à l'eau distillée ; après deux jours environ de dialyse on prélève toutes les trois heures un petit échantillon de la silice gélatineuse obtenue et on la soumet pendant dix minutes à la température de 120° jusqu'à ce que

la coagulation ne se produise plus dans ces conditions.

C'est à cette silice stérilisée qu'on ajoute les solutions telles que celles dont nous venons d'indiquer la composition et qui ont été stérilisées de leur côté ; on l'ensemence, on agite et on verse dans une boîte d'étain où s'effectue la coagulation. On constate que l'ammoniaque disparaît vers le huitième jour et que la réaction nitreuse apparaît vers le cinquième ; les colonies bactériennes ainsi obtenues sont très petites ; Omelianski a imaginé un procédé ingénieux pour les obtenir plus volumineuses ; il consiste à découper un petit segment sur la plaque gélatineuse et à y ajouter de temps en temps un peu d'une solution ammoniacale ; la plaque d'abord laiteuse devient peu à peu transparente par suite de la dissolution du carbonate de magnésium introduit ; les colonies, d'abord incolores, prennent une couleur d'un brun foncé et il devient possible de les prélever isolément et de les repiquer dans un nouveau milieu de culture.

Winogradsky reconnut, grâce à sa technique spéciale, qu'il existe deux sortes d'organismes concourant à la formation d'acide nitrique à partir de l'ammoniaque, des ferments nitreux transformant l'ammoniaque en acide nitreux, et des ferments nitriques amenant l'acide nitreux à l'état d'acide nitrique.

Ferments nitreux. — Nous avons déjà dit que Warington, reprenant les expériences de Schlœsing et Müntz, avait remarqué qu'au cours du phénomène de la nitrification il se produisait de l'acide nitreux et que la formation de ce corps paraissait précéder la production de l'acide nitrique. De son côté Wino-

GRADSKY, dans ses premiers essais d'isolement des bactéries de la nitrification, aboutit à des cultures pures d'organismes produisant presque uniquement des nitrites à partir des sels ammoniacaux ; il ne pouvait s'agir d'ailleurs d'une question d'aération insuffisante et on se trouvait en présence d'une fonction spécifique, celle des ferments nitreux.

Il en a été isolé un assez grand nombre d'espèces ; ce sont les *Nitrosomonas* de l'Ancien Monde et les *Nitrosococcus* américains ; le ferment de Zurich (fig. 47 A) est en particulier constitué par d'assez gros

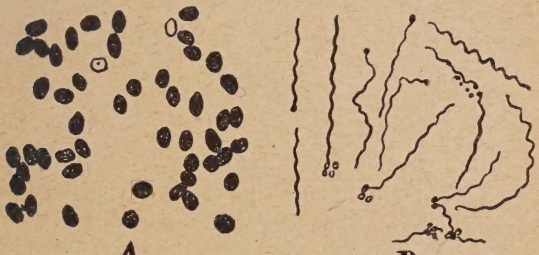


Fig. 47. — Ferments nitreux de Zurich (A) et de Java (B).

éléments sphériques, ciliés, donnant naissance à des zooglées, celui de Gennevilliers par des cellules coccoïdes petites, formant des chapelets.

Ensemencés sur un milieu minéral contenant un sel d'ammoniaque ils provoquent la formation de nitrite vers le quatrième jour ; vers le septième jour la culture devient opalescente ; cet aspect est dû à l'existence d'éléments mobiles qui vont jusqu'à la surface prendre de l'oxygène ; on constate qu'à ce moment il y a encore de l'ammoniaque dans le

liquide ; lorsque cette substance a disparu, la culture redevient transparente et le carbonate de magnésium se trouve inclus dans une masse mucilagineuse.

Toutes les circonstances de l'isolement et du fonctionnement de ces bactéries semblaient indiquer qu'elles n'avaient besoin pour se développer d'aucune matière organique ; leur carbone proviendrait alors de gaz carbonique de l'air ou du carbonate de magnésium introduit ; la question qui se posait était très importante, car on ne connaissait alors que les plantes vertes qui fussent capables d'utiliser le gaz carbonique de l'air comme source de carbone ; les végétaux dépourvus de chlorophylle étaient tous considérés comme empruntant leur carbone à des matières organiques plus ou moins complexes.

Winogradsky établit le fait de l'utilisation du gaz carbonique par les ferments nitreux, ainsi d'ailleurs que pour les ferments nitriques, d'une manière indiscutable en se mettant à l'abri de toutes les causes d'erreur possibles. Des dosages de carbone exécutés sur des liquides rigoureusement exempts au début de toute trace de matière organique et dans lesquels on mettait à se développer des *Nitrosomonas* ont montré que les quantités de carbone assimilé sont proportionnelles aux quantités d'ammoniaque disparue :

Azote oxydé . . .	19 mgr. 7	22 mgr. 4	26 mgr. 4
Carbone assimilé .	72 —	815 — 4	928 — 3
Carbone : Azote. .	36.6	36.4	35.2

On arrive ainsi à regarder l'oxydation de l'ammoniaque comme étant une réaction qui fournit au ferment l'énergie nécessaire pour décomposer le gaz carbonique ; la lumière qui agit chez les plantes vertes

pour produire cette décomposition serait ainsi remplacée ici pas une réaction chimique exothermique ; la synthèse de la matière organique du *Nitrosomonas* serait, non par un phénomène de photosynthèse, mais de chimiosynthèse ; c'est d'ailleurs le seul exemple bien connu d'organismes dépourvus de chlorophylle et utilisant cependant le gaz carbonique de l'air.

Godlewski a repris la question de savoir si c'était le gaz carbonique libre ou directement le carbonate de magnésium qui se trouvait constituer pour les bactéries nitreuses la source de carbone ; il montra que si dès le début on arrête le gaz carbonique de l'air passant dans la culture, on n'obtient aucun développement ; c'est donc bien le gaz carbonique libre qui est utilisé ; mais la dose initiale peut être très faible, car, à mesure que l'ammoniaque est oxydée, il se forme de l'acide nitreux qui libère du gaz carbonique à partir du carbonate de magnésium.

La nitrosation est influencée par la quantité d'ammoniaque contenue dans la solution ; elle s'arrête tout à fait pour une dose de 40 grammes de sulfate d'ammonium par litre. D'autre part les nitrites, à certaines doses, diminuent ou arrêtent la réaction ; il en est de même des nitrates.

Les substances organiques suivantes arrêtent la fermentation nitreuse aux doses indiquées ci-dessous (Winogradsky et Omeliansky) :

Glycérine	0,2	p. 100
Asparagine	0,05	—
Glucose	0,025	—
Peptone	0,025	—

et ce serait la multiplication des bactéries plus que

leur fonctionnement qui serait ainsi entravée par ces substances.

Enfin les ferments nitreux sont capables d'agir sur certaines bases azotées autres que l'ammoniaque, l'aniline, la pipéridine.., mais la fermentation est d'autant plus difficile qu'il s'agit de molécules plus complexes.

Ferments nitriques. — Winogradsky a isolé d'une terre de Quito (1891) une bactérie qu'il a rapportée au genre *Nitrobacter* (fig. 48), et par un procédé analogue à celui qu'il employa pour isoler les ferments nitreux ;

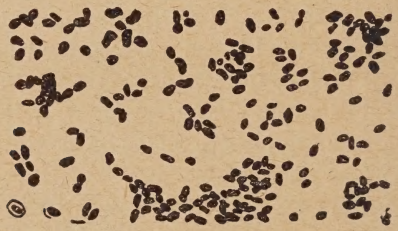


Fig. 48. — Nitrobactérie de Quito.

il remplaçait simplement le sulfate d'ammonium par du nitrite de sodium dans le milieu à silice gélatineuse. On peut également, comme l'a fait Beijerinck, remplacer la silice gélatineuse par de la gélose purifiée au préalable par plusieurs macérations dans l'eau et employer le milieu minéral suivant :

Eau de rivière	1000
Nitrite de sodium	1
Carbonate de sodium	2
Sulfate de magnésium	traces
Phosphate dipotassique	traces
Gélose	15

Le *Nitrobacter* isolé par WINOGRADSKY est une bactérie très petite (o μ 5) et qui ne se développe pas en présence d'ammoniaque, mais qui transforme les nitrites en nitrates.

On arrive ainsi à regarder le phénomène de la nitrification comme résultant de deux fermentations successives, la fermentation nitreuse et la fermentation nitrique proprement dite, préparée par la première.

La nitrification dans le sol. — Mais il n'était pas inutile de se demander si c'est bien ainsi que les choses se passent dans les conditions naturelles, à l'intérieur du sol.

WINOGRADSKY a refait des expériences analogues aux précédentes en prenant comme milieu de culture de la terre arable stérilisée et humectée d'eau contenant une petite quantité de sulfate d'ammonium ; si on ensemence avec le ferment nitreux on obtient de l'acide nitreux et cette substance seulement ; le ferment nitrique seul ne produit aucune action ; les deux sortes de bactéries associées donnent naissance uniquement à de l'acide nitrique, comme c'est le cas pour la même terre arable non stérilisée et abandonnée à elle-même ; c'est que dans ce cas l'acide nitreux n'apparaît que comme un intermédiaire entre l'ammoniaque et l'acide azotique en lequel il est transformé au fur et à mesure de sa formation.

Ce n'est pas ce qui se produit dans les milieux liquides ; lorsqu'on ensemence ceux-ci avec les deux sortes de ferments il se forme surtout de l'acide nitreux, et cela tiendrait d'après WINOGRADSDY à ce que, dans ces conditions, le ferment nitreux se déve-

loppe beaucoup plus rapidement que l'autre et, lorsque le ferment nitrique commence à agir, presque tout l'oxygène a disparu pour assurer le fonctionnement de la bactérie nitrique ; dans la terre il y aurait toujours suffisamment d'oxygène à la disposition du ferment nitrique en raison de la grande porosité du milieu.

Mais d'autres raisons interviennent encore pour expliquer la manière différente dont les phénomènes de nitrification se passent dans des cultures liquides ou dans le sol ; l'une d'entre elles porte sur les conditions dans lesquelles se multiplient les bactéries des deux sortes. Boullanger et Massol ont montré que si on enlève aseptiquement le liquide d'un matras à scories où vient de s'achever une nitrification et où par suite se trouvent développées des bactéries nitreuses et des bactéries nitriques, et qu'on le remplace par 1 litre d'un liquide contenant 12 grammes de sulfate d'ammonium on obtient dans les jours qui suivent les quantités ci-dessous de nitrite et de nitrate (évaluées en sels de sodium) :

Durée (jours)	Nitrite de sodium	Nitrate de sodium
0	0	0 gr. 537
8	traces	
10	0 gr. 148	0 gr. 823
11	0 — 146	0 — 951
13	0 — 191	1 — 186
14	traces	1 — 426
15	0	1 — 732
17	0	2 — 236
18	0	2 — 324

La teneur en nitrite est toujours assez faible, alors que les nitrates ont augmenté d'une manière constante ;

les deux fermentations ont d'ailleurs été simultanées; la symbiose a donc été réalisée ici du premier coup, alors que les deux bactéries s'étaient développées antérieurement dans le vase de culture ; lorsqu'on procède au contraire à un ensemencement au début d'une expérience de nitrification, il arrive que la bactérie nitrique se développe beaucoup plus lentement que la bactérie nitreuse et cela du fait de la présence d'ammoniaque libre ; quand cette dose atteint 200 milligrammes par litre, tout développement cesse et on comprend que la fermentation nitreuse se produise seule ; l'ammoniaque libre n'agit pas au contraire sur les propriétés fermentatives de bactéries déjà développées, comme celles dont on part dans les expériences de Boullanger et Massol ; or dans les conditions naturelles on se trouve en présence de supports rocheux qui se comportent comme les scories des matras précédemment utilisés, c'est-à-dire que l'association des deux bactéries se trouve réalisée d'avance.

Le phénomène d'association des bactéries nitreuses et nitriques n'est pas d'ailleurs le seul qui intervienne dans la formation des nitrates à l'intérieur du sol et il est évident que toutes les bactéries qui sont capables de transformer la matière organique en ammoniaque favorisent la nitrification ; c'est ce qu'a montré directement Omeliansky en associant aux ferments nitreux et nitrique le *Bacillus ramosus* ; cet auteur a réussi à produire le phénomène de nitrification d'un bouillon de viande en l'ensemençant simultanément par le *Bacillus ramosus* (*a*), le *Nitrosomonas* (*b*) et le *Nitrobacter* (*c*). Si on n'ensemence que les organismes *a* et *b* on obtient de l'acide nitreux ; si on n'introduit que *b*

et *c* le bouillon reste sans modification, les deux bactéries étant incapables de transformer les substances organiques en ammoniaque.

Signalons enfin l'existence d'un ferment, le *Bacillus nitrator*, étudié par KASERER et qui, en l'absence de matières organiques, est capable d'oxyder l'ammoniaque directement en acide nitrique.

L'étude du phénomène de la nitrification s'opérant en milieux liquides artificiels montre que la présence de substances organiques est défavorable ; or, dans les sols où apparaît de l'acide nitrique, il existe souvent des matières organiques constituant l'humus, et celles-ci paraissent au contraire favoriser la fermentation ; elles constituent tout d'abord une source d'ammoniaque ; mais, indépendamment de ce fait, elles augmentent la production d'acide nitrique ; c'est ce qu'ont établi MÜNTZ et LAINÉ en ajoutant à des terres plus ou moins riches en matières organiques 1 ou 2 p. 1000 de sulfate d'ammonium ; les quantités (mgr.) d'azote nitrique formé par kilo de terre ont été les suivantes :

		Terre de jardin	Terreau consommé	Terre silico-calcaire	Terre argileuse	Terre argilo-calcaire
Teneur en carbone p. 100.		3,8	17,6	1,5	1	1,5
0,1 p. 100 sulfate d'ammonium.	2 jours.	36	117	0	9	5
	7 jours.	90	207	37	40	20
0,2 p. 100 sulfate d'ammonium.	7 jours.	282	411	7	64	64

Il y a donc manifestement d'autant plus d'azote nitrifié que le sol contient plus de carbone ; mais l'humus apparaît comme ayant surtout un rôle au début de la nitrification ; si on provoque en effet une fermentation continue par addition de sulfate d'am-

monium, jusqu'à l'établissement d'un régime normal, on trouve par exemple au bout de trente-deux jours les quantités suivantes d'azote nitrifié pour les 5 lots précédents de terre :

743 1 346 653 906 871

C'est encore par le terreau consommé que le rendement est le plus considérable, mais on voit combien les différences se sont atténuées.

L'humus ne possède donc pas vis-à-vis des ferments de la nitrification les mêmes propriétés toxiques que les substances organiques diffusibles dans les milieux liquides (glucose, glycérine...); d'autres expériences, réalisées en milieux liquides, ont d'ailleurs montré que le rendement en acide nitrique est à peu près le même avec l'humate d'ammonium (236) qu'avec le sulfate d'ammonium (206).

En résumé les bactéries nitreuses et nitriques existent partout et il y aura nitrification de l'ammoniaque chaque fois qu'un certain nombre de conditions seront remplies : présence de calcaire dont il suffit d'ailleurs de quelques millièmes, quantité d'eau convenable (la dose de 20 p. 100 est généralement la meilleure), aération suffisante (les façons qu'on fait subir au sol l'augmentent sensiblement). L'humus naturel nitrifie toujours, mais assez lentement; l'azote non humifié (engrais verts, fumiers, tourteaux) subit une transformation plus rapide, mais à condition que le carbone organique diffusible ne soit pas trop abondant; sinon il se produit un phénomène antagoniste du précédent; l'acide nitrique ne se produit plus et celui qui s'était formé disparaît par réduction.

Le phénomène de la nitrification permet d'expliquer comment les substances organiques azotées qui se trouvent dans le sol, subissant une série de transformations, aboutissent à la formation des nitrates qui constituent la source essentielle d'azote pour les végétaux ; il en est de même pour les sels ammoniacaux dont on se sert comme engrais, qui peuvent être, nous l'avons vu, utilisés directement par les plantes supérieures, mais sont surtout le point de départ de la formation de nitrates ; cette transformation est particulièrement active dans les sols légers, aérés, et c'est à ceux-ci qu'on devra surtout appliquer l'emploi de sels ammoniacaux ou de substances organiques capables de subir l'ammonisation ; on réservera par suite l'emploi des nitrates pour les sols compacts, dans lesquels la nitrification est toujours moins active.

La formation de salpêtre que nous avons signalée plus haut sur les murs humides, en présence de matières organiques, n'est qu'un phénomène de nitrification de grande intensité et c'est en tenant compte des conditions naturelles de son apparition qu'on a pu, au moment des guerres de la République et de l'Empire, réaliser des nitrières artificielles à grand rendement, en vue de la fabrication de la poudre. Il apparaît des produits analogues dans plusieurs régions des Indes Orientales, à Ceylan, dans l'Amérique du Sud (azotate de sodium du Chili), en Egypte et en Algérie et toujours dans des conditions semblables, c'est-à-dire sous l'action des microorganismes que nous venons de considérer.

La nitrification présente un grand intérêt pour le

développement des plantes supérieures et il convient de la favoriser en agriculture ; mais les nitrates ont sur les sels ammoniacaux dont ils proviennent un désavantage qu'il convient de signaler ; ils sont beaucoup plus facilement entraînés par les eaux de pluie que l'azote ammoniacal ou organique de sorte que de ce fait la nitrification peut constituer une perte en azote pour le sol.

Il s'agit d'un phénomène d'adsorption qui est intense pour l'ammoniaque et très faible ou nul pour les nitrates. Il suffit pour s'en rendre compte de filtrer à travers de la terre une solution d'un sel d'ammonium ou d'un nitrate ; on constate que dans le premier cas la solution s'appauvrit beaucoup en ammoniaque et qu'au contraire le taux de nitrate ne se modifie que très peu ; on peut encore laver de la terre avec de l'eau distillée ; on observe qu'après cet épuisement la terre contient encore une quantité appréciable d'ammoniaque alors qu'elle a abandonné à peu près tous les nitrates qu'elle contenait.

C'est pour parer à cet inconvénient qu'on a recours en agriculture aux *cultures* dites *intercalaires* ou dérobées. Elles consistent à semer, par exemple après la moisson, au mois d'août, dans une terre où on a cultivé une céréale, une plante à croissance rapide telle que la Moutarde et à l'enterrer au mois de novembre ; l'azote nitrique qu'elle a absorbé et qui a été transformé en azote protéique est de la sorte immobilisé pendant l'hiver ; il sera ammonisé, puis nitrifié au printemps suivant et utilisé par une nouvelle culture au fur et à mesure de la transformation.

E. Dénitrification

A la suite de ses recherches sur le phénomène de la nitrification, Schloesing fut amené à l'étude d'un phénomène inverse, celui de la réduction des nitrates et leur décomposition en un mélange, en proportions variables, de bioxyde d'azote, de protoxyde d'azote et d'azote libre ; l'expérience fondamentale de Schloesing consiste à placer de la terre calcaire additionnée de nitrate de potassium (7 gr. 5 pour 12 kilos de terre) dans un flacon de 10 litres, auquel on adapte un tube à dégagement se rendant sous le mercure et destiné à recueillir les gaz ; pendant les quatre premiers jours le mercure s'élève progressivement dans le tube, l'oxygène étant absorbé par les organismes du sol et le gaz carbonique formé se combinant aux carbonates neutres. A partir du cinquième jour la pression commence à croître ; au bout de quinze jours elle devient égale à la pression atmosphérique et le vingt-cinquième jour on constate un violent dégagement de gaz ; le phénomène a pris fin au bout de deux mois.

L'atmosphère qui se trouvait alors dans le flacon ne contenait pas trace de bioxyde d'azote ni de protoxyde d'azote ; elle était exclusivement constituée par du gaz carbonique et de l'azote libre. Quant à l'acide nitrique (4 gr. 853 au début), il avait complètement disparu ; on constatait par contre une augmentation en ammoniaque (101 mgr. par les 12 kilos) ; or si tout l'acide nitrique avait été transformé en ammoniaque on aurait dû trouver une augmentation de 1 gr. 528 de cette dernière substance ; l'excès d'azote s'est dégagé à l'état libre, ainsi qu'en témoigne l'analyse de l'atmosphère finale.

Une seconde expérience a montré qu'en l'absence d'oxygène non seulement une terre nitratée perd tout l'azote contenu dans le nitrate, mais qu'elle en perd même davantage, cet excès provenant, sans aucun doute, des substances organiques.

Ce phénomène, qui apparaît comme capital au point de vue de l'étude du cycle de l'azote dans le sol et au point de vue des pratiques agricoles, a fait l'objet de nombreuses études ultérieures. Il résulte encore de l'intervention de microorganismes, mais ceux-ci sont beaucoup plus nombreux et moins spécifiques que ceux de la nitrification ; les réactions qui aboutissent à la réduction des nitrates sont d'ailleurs assez variées ; tantôt les nitrates sont transformés en nitrite et ammoniaque, tantôt, à partir des nitrates ou des nitrites, on aboutit à la production de protoxyde ou de bioxyde d'azote ; enfin, comme dans les expériences de Schloesing la réduction peut aller jusqu'à la formation d'azote libre.

Pour mettre le phénomène en évidence on peut utiliser différents liquides, tels que celui de Gayon, ainsi constitué :

Eau	1000
Azotate de potassium	10
Acide citrique	7
Asparagine	5
Phosphate de sodium	5
Sulfate de magnésium	5
Chlorure de calcium	0,5
Sulfate d'aluminium	0,02
Silicate de sodium	0,02
Sulfate ferreux	0,05
Ammoniaque	q. s. pour rendre le liquide faiblement alcalin

Ce liquide, ensemencé avec un peu de fumier de cheval ou de paille et maintenu à 35°, donne naissance à un abondant dégagement gazeux ; par des reports successifs on peut arriver à purifier les espèces microbiennes agissantes ; Gayon et Dupetit ont ainsi obtenu deux bactéries, *Bacterium denitrificans* α et β, qui donnent du bioxyde d'azote, de l'azote et du gaz carbonique.

On peut admettre comme formules de réaction les suivantes, où le carbone porté dans le premier nombre correspond par exemple à de l'acide citrique :

$$2\,AzO^3K + C = 2\,AzO^2K + CO^2$$
$$2\,AzO^2K + C = Az^2O + CO^3K^2$$
$$2\,Az^2O + C = 2\,Az^2 + CO^2$$
$$2\,AzO^3K + 2\,C = Az^2O + CO^3K^2 + CO^2$$

Il existerait aussi des bactéries qui, ne réduisant pas les nitrates, décomposent le protoxyde d'azote qui leur sert de source d'oxygène.

De nombreux autres expérimentateurs ont de la même manière isolé un grand nombre de microorganismes dénitrificateurs. C'est ainsi que Burri et Stützer isolèrent du crottin de cheval les *Bacterium denitrificans* I et II ; le premier de ces microbes vit en symbiose avec le *Bacterium coli commune* à qui reviendrait la transformation du nitrate en nitrite, le *B. denitrificans* I amenant à son tour le nitrite à l'état d'azote gazeux ; quant au *B. denitrificans* II il est capable à lui seul de produire cet azote à partir de l'azotate.

Les travaux de Grimbert (1898-99) aboutirent ensuite à une nouvelle notion ; l'auteur étudia parallèlement deux organismes dénitrificateurs, le *Bacillus pyocyaneus* et le *Bacillus coli commune*, en les cultivant sur

de l'eau à laquelle il ajoutait 1 p. 100 de peptone et 1 p. 100 d'azotate, ou sur du bouillon de viande auquel il incorporait les mêmes quantités de peptone et d'azotate. Le *Bacillus pyocyaneus* détermine dans le premier milieu la transformation de l'azotate et on observe un dégagement d'azote pur ; il se produit bien du gaz carbonique dans la réaction, mais il se combine à la base devenue libre de l'azotate décomposé et le milieu devient nettement alcalin. On a affaire à un *dénitrificateur direct* ou vrai et l'oxygène du nitrate est employé à oxyder la matière carbonée ; on constate ici que le volume de l'azote dégagé est égal au volume de l'azote du nitrate décomposé.

Passons au *Bacillus coli commune* ; dans le milieu aqueux il ne donne pas naissance à un dégagement d'azote ; on n'observe qu'une transformation du nitrate en nitrite : mais avec le liquide à base de bouillon de viande on observe un abondant dégagement gazeux et il est facile de se rendre compte que le volume d'azote dégagé est le double du volume de l'azote correspondant au nitrate disparu. Grimbert a montré que la moitié de l'azote dégagé provenait d'une réaction secondaire, s'opérant entre le nitrite formé par l'action du bacille sur les nitrates et des substances aminées ou amidées contenues dans le liquide. L'acide nitreux réagit sur ces dernières en donnant de l'azote et du gaz carbonique, celui-ci se combinant à l'alcali du nitrite, d'où maintien de la neutralité du liquide. On obtient par exemple avec l'urée la réaction

$$CO(AzH^2)^2 + \underset{2\ vol.}{2\,Az\ O^2H} = \underset{4\ vol.}{2\,Az^2} + CO^2 + 3\,H^2O$$

et avec l'asparagine

$$C^4H^8Az^2O^3 + 2\,AzO^2H = \underset{\text{Ac. malique}}{C^4H^6O^5} + 2\,Az^2 + 2\,H^2O$$

De tels microorganismes sont désignés sous le nom de *dénitrificateurs indirects*, et on voit que pour isoler les dénitrificateurs vrais il est nécessaire d'utiliser des liquides dépourvus de corps aminés ou amidés.

Les bactéries capables de provoquer le phénomène de dénitrification sont très fréquentes dans l'air, dans les eaux, dans le sol et particulièrement sur la paille et sur les excréments animaux ; G. et F. Frankland ont reconnu la propriété en question à 17 bactéries sur 32 isolées du sol, Warington a trouvé de son côté une proportion de 17 sur 25, Masson de 85 sur 109. Certaines bactéries pathogènes possèdent également le pouvoir dénitrificateur (*Micrococcus ureæ*, *Bacillus ramosus*, *Bac. violaceus*) ; il en est de même pour différentes Mucédinées, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium glaucum*, *Mucor racemosus*, *Alternaria...*, qu'on rencontre dans le sol, la paille, les excréments ; on est donc en présence d'une propriété assez banale qui se manifeste dès qu'il existe un nitrate, une substance organique et une dose modérée d'oxygène ; ces organismes sont en effet des êtres aérobies et, si l'oxygène en trop grande abondance gêne le phénomène de la dénitrification, il n'a pas d'action sur la multiplication même du ferment.

On a établi un certain nombre de catégories basées sur l'intensité du phénomène réalisé par les différentes espèces et on a par exemple distingué :

Les dénitrificateurs énergiques (Vibrion cholérique, le Bacille typhique des souris, le *Bacillus aerogenes*) ;

Les dénitrificateurs moyens (*Bacillus typhosus*, *Bacillus coli*) ;

Les dénitrificateurs faibles (streptocoques, staphylocoques).

Il semble bien que la dénitrification complète soit très généralement précédée de la formation de nitrite, mais le mécanisme est assez variable avec les divers organismes ; Beijerinck et Van Delden ont de leur côté constaté que l'*Azotobacter chroococcum* possède la faculté de transformer les nitrates en ammoniaque sans formation intermédiaire de nitrite.

Nous venons de voir implicitement que le phénomène de dénitrification nécessite la présence d'une substance organique ; un très grand nombre de sucres, d'acides organiques peuvent intervenir ; ce sont par exemple la glycérine, la mannite, les sucres réducteurs, l'amidon, la cellulose, les pentosanes, les acides lactique, citrique, malique, butyrique et surtout l'acide propionique.

On conçoit l'intervention fâcheuse que peut présenter la dénitrification dans le sol, puisqu'elle correspond à une destruction des azotates et à une perte définitive d'azote. Bréal a donné une reproduction expérimentale de ce qui doit se passer dans le sol en plaçant dans un vase de la paille et en versant de l'eau distillée additionnée de nitrate de potassium ; si on dose l'azote de la paille et du liquide au début de l'expérience et au bout d'un mois on obtient les résultats suivants :

Azote total.	Au début.	Paille . .	9 mgr. 7	35 mgr. 7
		Nitrate. .	26 —	
	A la fin			27 — 1
			Perte. . .	8 — 6

Il s'est produit une perte d'azote représentant à peu près le tiers de celui qui a été introduit sous forme de nitrate.

Le fumier renferme à la fois de nombreux dénitrificateurs et des hydrates de carbone ; il réalise donc les conditions requises pour la dénitrification et on s'est demandé ce qu'il advenait de l'adjonction au sol de l'addition d'un tel engrais organique. Cette question est évidemment de première importance au point de vue agricole ; Wagner et d'autres expérimentateurs constatèrent qu'en fait le sol subit une perte de nitrates quand on y ajoute du fumier, d'où la conclusion qu'il convenait de renoncer à l'emploi du fumier comme engrais. Dehérain a repris ces expériences et a montré qu'il s'agissait d'une question de dose ; avec les quantités de fumier employées normalement les pertes en azotates deviennent insensibles ; elles ne deviennent importantes qu'avec des doses exagérées de fumier. On a proposé un moment, pour empêcher la dénitrification du fumier, d'additionner celui-ci d'eau sulfurique (0,2 p. 100) qui agit comme antiseptique ; mais ce liquide a le grave inconvénient d'arrêter également toutes les autres fermentations.

Une humidité considérable du sol favorise la dénitrification, probablement en diminuant l'accès de l'oxygène ; la disparition des azotates est également importante quand le taux d'humidité tombe au-dessous de 6 p. 100, les ferments nitrifiants ayant besoin d'un minimum de 10 p. 100 d'eau.

Le maximum d'activité des ferments dénitrifiants a lieu à une température assez basse, incompatible avec le développement normal des bactéries de la nitrification.

Cycle de l'azote. — D'après les faits que nous venons d'apprendre relativement à l'azote et à ses composés dans leurs rapports avec les végétaux, le cycle de l'azote à la surface de la terre se trouve être sensiblement plus compliqué que celui du carbone.

Si nous partons de l'azote atmosphérique nous avons reconnu qu'il pouvait être utilisé directement par différents microorganismes, le *Rhizobium Leguminosarum* qui vit en symbiose dans les racines des Légumineuses, et par certaines bactéries du sol (*Clostridium, Azotobacter...*).

D'autre part les plantes supérieures utilisent l'ammoniaque et l'acide nitrique de l'air et du sol ; aux dépens de ces différentes sources il se constitue des substances protéiques qui peuvent être à leur tour utilisées par les animaux.

Les substances organiques azotées contenues dans les débris des végétaux, dans les cadavres ou les déjections des animaux subissent à l'intérieur du sol une série de transformations biologiques amenant en particulier la formation d'ammoniaque, dont une partie peut se dégager dans l'air ; cette ammoniaque subit à son tour l'action de microorganismes l'amenant à l'état de nitrites, puis de nitrates, source la plus efficace d'azote pour les organismes supérieurs ; enfin un phénomène inverse peut ramener les nitrates à l'état de nitrite et même d'azote gazeux, avec lequel le cycle se trouve fermé.

Les nitrates du sol sont facilement entraînés par les eaux d'infiltration et sont conduits par les rivières jusqu'à la mer où ils sont transformés biologiquement en sels ammoniacaux ; il se dégage à la surface

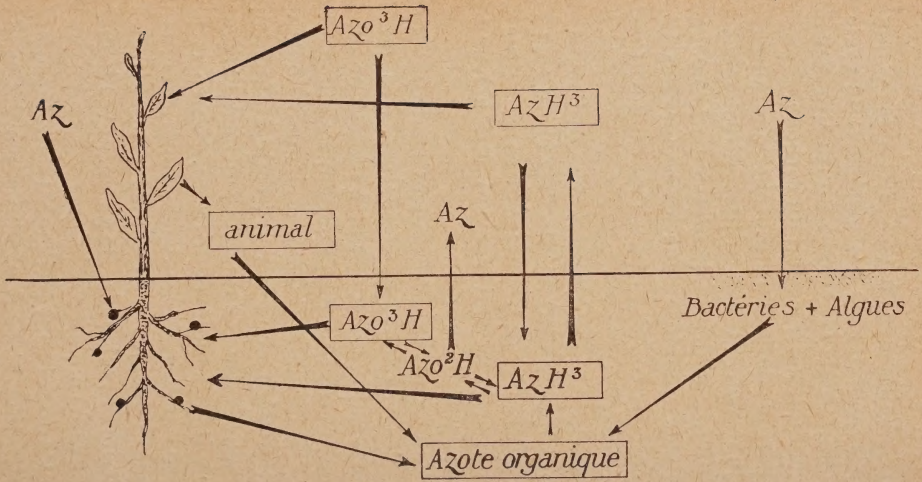


Fig. 49. — Schéma du cycle de l'azote.

de la mer de l'ammoniaque en même temps que de la vapeur d'eau et cette ammoniaque retourne au sol par les eaux de pluies ou par voie d'absorption directe.

Le fait essentiel qui domine toutes ces transformations est la part qui revient dans leur réalisation aux microorganismes se développant dans le sol ; il existe une véritable symbiose entre eux et les végétaux supérieurs ; on peut la mettre facilement en évidence en établissant des cultures d'une plante vasculaire dans des pots remplis d'une même terre, mais stérilisée ou non par la chaleur (120°), rien n'est changé à la composition chimique de la terre par cette opération et cependant on constate que la végétation est très réduite quand on a supprimé les bactéries ; c'est qu'on a arrêté la transformation des substances azotées complexes en matières assimilables (ammonisation et nitrification) ; le sol doit donc être considéré comme un milieu vivant au point de vue de la manière dont il se comporte vis-à-vis des plantes supérieures.

Nous retrouvons d'autre part à propos de l'azote le même rôle important des végétaux à la surface du globe, que nous avons signalé touchant le carbone ; les animaux se trouvent encore à ce point de vue dans une étroite dépendance vis-à-vis des plantes, qui forment un trait d'union indispensable entre le monde minéral et le monde animal.

CHAPITRE VI

SUBSTANCES AZOTÉES NON PROTÉIQUES

Nous examinerons dans ce chapitre un certain nombre de substances végétales qui contiennent de l'azote, mais ne rentrent pas dans la catégorie des protéines ou de leurs dérivés étudiés précédemment ; ces substances appartiennent à quatre groupes essentiels qui sont :

1° Les glucosides qui renferment, combiné à un reste de glucose, un corps azoté différent du cyanogène ;

2° L'acide cyanhydrique et les glucosides cyanogénétiques ;

3° Les alcaloïdes ;

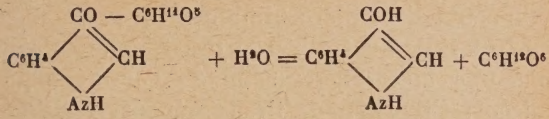
4° Les lipoïdes azotés et phosphorés.

1. Glucosides azotés non cyanogénétiques

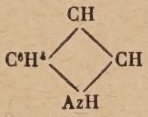
Le type de ces substances est l'indican $C^{14}H^{17}O^{6}Az + 3H^{2}O$. C'est une substance incolore qui se rencontre dans les plantes dites à indigo : différentes espèces d'*Indigofera*, *Isatis tinctoria*, *Marsdenia tinctoria*, *Polygonum tinctorium*, plusieurs espèces d'Orchidées appartenant aux genres *Phajus* et *Calanthe*.

Sous l'action des acides étendus ou d'une diastase

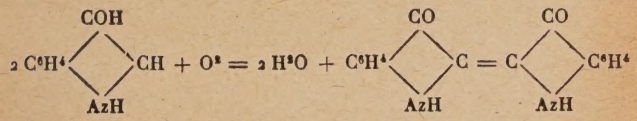
spéciale contenue dans la plante l'indican se dédouble en glucose et indoxyle :



L'indoxyle dérive de l'indol, dont nous avons vu la parenté avec les substances protéiques et qui est un phénopyrrol



Incolore l'indoxyle peut être à son tour oxydé, soit artificiellement, soit par une diastase oxydante contenue dans la plante, et donne naissance à une substance bleue, l'*indigo* ou indigotine :



Ce sont ces réactions qui se produisent successivement dans l'extraction industrielle de l'indigo.

Pour reconnaître si une plante peut fournir de l'indigo, Molisch conseille de procéder de la manière suivante. On chauffe des fragments du végétal pendant une demi-minute en présence d'ammoniaque ou d'acide chlorhydrique à 2 p. 100, on filtre et on ajoute après refroidissement un peu de chloroforme ; si la plante contient de l'indican, la couche de chloroforme

se colore dans l'un ou l'autre des cas ou dans les deux en bleu ou en violet.

On peut opérer microchimiquement en abandonnant pendant vingt-quatre heures des fragments d'organe dans une atmosphère saturée d'ammoniaque ou d'alcool ; s'il s'agit de tissus dépourvus de chloro-

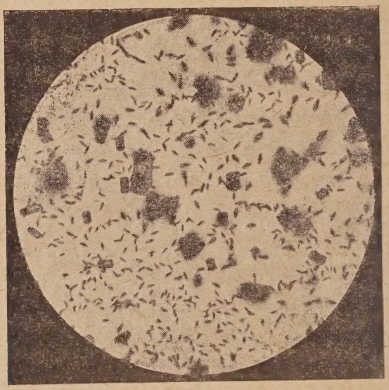


Fig. 50. — Cristaux de bleu d'indigo obtenus par sublimation.

phylle, la teinte bleue de l'indigo apparaît sans autre traitement ; si l'organe est riche en chlorophylle, on dissout celle-ci dans l'alcool absolu et la coloration bleue devient facilement apparente.

Le bleu d'indigo peut s'extraire des tissus où il s'est constitué par voie de sublimation ; on obtient ainsi des cristaux d'un bleu foncé en forme d'aiguilles, de prismes, groupés de façons variées (fig. 50).

Beijerinck a remarqué que certaines plantes à indigo ne transforment en indigotine qu'une petite

partie de leur indican sous l'action de l'alcool et de l'ammoniaque ; il explique le fait par une destruction de la diastase opérée par les réactifs employés et il a proposé de tuer les organes par immersion sous le mercure qui tue le protoplasme sans agir sur la diastase ; si on fait alors agir l'ammoniaque on obtient une coloration bleue beaucoup plus intense que dans les conditions précédentes.

L'indican s'observe surtout dans le parenchyme chlorophyllien ; les racines n'en contiennent pas ou seulement de très faibles quantités ; les graines et les fruits en sont dépourvus ; Beijerinck pense que l'indican est contenu dans le cytoplasme et que la diastase correspondante se trouve dans les chloroleucites.

2. Acide cyanhydrique et composés cyanogénétiques

Il convient d'étudier à part toute une série de substances végétales constituées par l'acide cyanhydrique libre ou capables de donner naissance à ce corps par dédoublement ; nous en étudierons la présence et la répartition, puis nous envisagerons l'état de ces connaissances touchant leur rôle physiologique.

Acide cyanhydrique

Greshoff (1891) a mis en évidence la présence de l'acide cyanhydrique libre, ou tout au moins à l'état de combinaison très instable, dans tous les organes du *Pangium edule* (Bixacée de Java) ; Treub a montré qu'un seul individu de cette espèce peut renfermer

l'énorme proportion de 350 grammes de la substance en question ; ce composé existe surtout dans la région libérienne et péricyclique, ainsi que dans certaines cellules spéciales de l'écorce et de la moelle; l'établissement de cette localisation microchimique est aisé par la formation de bleu de Prusse en présence d'acide chlorhydrique, de perchlorure de fer et de sulfate ferreux. Dans le fruit en voie de développement les cellules spéciales sont très nombreuses ; dans les graines il en existe à la périphérie de l'albumen et au contact des cotylédons ; ceux-ci en sont eux-mêmes très richement pourvus.

Composés cyanogénétiques

L'acide cyanhydrique peut d'autre part apparaître dans de nombreuses plantes lors de la décomposition, sous l'action de diastases, de corps rentrant dans la catégorie des *glucosides* ; on sait qu'il s'agit de substances qui, par hydrolyse, donnent naissance à un sucre ordinairement réducteur, qui est le plus souvent du glucose, et à d'autres corps de nature assez variable ; nous avons précédemment considéré les glucosides qui ne contiennent pas d'azote dans leur molécule ; considérons ici ceux qui sont azotés; le plus connu est l'amygdaline.

Amygdaline.— Découverte par Robiquet et Boutroux en 1830, elle existe abondamment dans les graines de l'Amandier, du Pêcher, de l'Abricotier, du Prunier et de plusieurs Pomacées. Si on vient à broyer des amandes amères en présence d'eau, on perçoit rapide-

ment l'odeur caractéristique de la benzaldéhyde et on peut constater qu'en même temps il se forme du glucose et de l'acide cyanhydrique ; c'est l'amygdaline qui est décomposée dans ces conditions suivant la réaction

$$C^{20}H^{27}AzO^{11} + 2\,H^2O = 2\,C^6H^{12}O^6 + C^6H^5.COH + CAzH$$

Le fait tient à ce que les amandes amères contiennent à la fois de l'amygdaline et une diastase correspondante, l'*émulsine* ; ces deux substances sont contenues dans des cellules différentes et ne réagissent pas par suite à l'état normal ; mais si on les amène au contact l'une de l'autre par le broyage, le dédoublement de l'amygdaline s'opère aussitôt. Nous avons déjà eu l'occasion de faire allusion à l'action de l'émulsine et nous avons constaté qu'elle était capable d'opérer le dédoublement de nombreux glucosides non azotés.

On peut extraire l'amygdaline en traitant des amandes amères de la manière suivante. Immergées rapidement dans l'eau chaude les téguments se gonflent et se détachent facilement de l'amande ; ils sont enlevés et les amandes sont pilées au mortier ; on ajoute de l'éther et on laisse plusieurs heures en contact ; la masse est filtrée, lavée à l'éther, et de la sorte on élimine l'huile de la plantule ; le résidu se trouve contenir à la fois l'amygdaline et l'émulsine. On traite alors rapidement par trois volumes d'alcool à 95° bouillant, qui dissout l'amygdaline ; la masse est à nouveau filtrée et le liquide alcoolique évaporé dans le vide ; en ajoutant un volume d'éther on détermine la précipitation de l'amygdaline ; on filtre à nouveau, on

dissout dans un peu d'eau et on évapore dans un exsiccateur où l'amygdaline apparaît à l'état cristallisé ; le traitement à l'alcool bouillant doit être effectué rapidement, car l'émulsine et l'amygdaline sont alors en présence et capables de réagir l'une sur l'autre.

Incolore, à saveur amère, l'amygdaline, traitée à chaud par l'acide chlorhydrique dilué, est décomposée comme nous venons de l'indiquer lorsqu'il s'agissait de l'intervention de l'émulsine.

Pour obtenir l'émulsine, on peut également partir des amandes amères, mais il est préférable de s'adresser à des amandes douces, correspondant à une variété bien connue de l'Amandier, car on est alors en présence de graines qui contiennent de l'émulsine, mais pas d'amygdaline, ou seulement de très faibles quantités de cette substance. Les graines émondées sont broyées et débarrassées de leur huile par l'éther ; le résidu est traité pendant vingt-quatre heures par de l'eau chloroformée ; on filtre et le liquide est additionné d'acide acétique qui précipite les protéines ; on filtre à nouveau et on additionne de trois à quatre volumes d'alcool à 98° ; l'émulsine se dépose ; le précipité est soluble dans l'eau. Conservée à l'état sec l'émulsine garde longtemps ses propriétés. Si on fait agir une solution de la diastase ainsi préparée sur l'amygdaline précédemment obtenue, on réalise l'hydrolyse de celle-ci comme il a été indiqué.

Des recherches récentes d'Armstrong ont établi qu'en réalité il intervient dans la réaction deux diastases différentes ; l'une, l'amygdalase, dédouble l'amygdaline en glucose et prunasine, l'autre, la pru-

nase, produit à partir de la prunasine du glucose, de l'acide cyanhydrique et de l'essence d'amandes amères (aldéhyde benzoïque) suivant les deux formules :

$$C^{20}H^{27}AzO^{11} + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^{14}H^{17}AzO^6$$

et

$$C^{14}H^{17}AzO^6 + H^2O = C^6H^{12}O^6 + CAzH + C^6H^5.COH$$

On peut localiser microchimiquement l'émulsine à l'aide du réactif de Millon que nous avons vu s'appliquer à l'ensemble des matières protéiques ; la quantité relativement grande d'émulsine existant dans les cellules spéciales détermine une coloration rose, puis rouge, plus rapide et plus intense que celle que finissent par donner toutes les autres cellules. On obtient de même une coloration violette des cellules contenant de l'émulsine quand on traite une coupe à chaud par de l'acide chlorhydrique additionné d'orcine. On constate ainsi que les cellules à émulsine des amandes amères se trouvent surtout autour des faisceaux, dans le péricycle et même l'endoderme.

Quant à l'amygdaline on peut la localiser par l'acide cyanhydrique qui en provient et employer par exemple la méthode utilisée par Treub. Les coupes sont tout d'abord traitées rapidement par une solution alcoolique de potasse, puis portées pendant dix minutes dans une solution aqueuse de sulfate ferreux et de perchlorure de fer et enfin pendant cinq minutes dans une solution à 20 p. 100 d'acide chlorhydrique ; il se forme du bleu de Prusse dans les cellules qui ont produit de l'acide cyanhydrique.

On a utilisé également la réaction de l'acide cyanhydrique sur l'azotate de mercure, aboutissant à la

formation de mercure métallique noir et de cyanure de mercure soluble dans l'eau

$$2(AzO^3)^2Hg + 2\,CyK = 2\,AzO^3K + Cy^2Hg + Hg$$

Autres composés cyanogénétiques. — Beaucoup de plantes contiennent des glucosides analogues à l'amygdaline et donnant naissance en particulier à l'acide cyanhydrique. C'est précisément par la formation de cette dernière substance qu'on en peut reconnaître l'existence ; pour déceler le dégagement d'acide cyanhydrique par les organes qu'on a eu soin de broyer ou de traiter au préalable par le chloroforme, de manière à mettre en contact le glucoside et la diastase correspondante, on utilise fréquemment un papier imprégné de picrate de sodium ; pour le préparer il suffit de tremper des morceaux de papier filtre dans une solution à 1 p. 100 d'acide picrique et de les laisser se dessécher à l'air ; au moment où on veut en faire usage on les trempe dans une solution à 1 p. 100 de carbonate de sodium ; un de ces papiers suspendu dans le col d'un vase où se trouve l'organe qu'on veut examiner prend, au lieu de la coloration jaune primitive, une couleur orangée ou rouge brique, par suite de la formation d'acide picramique.

Les glucosides cyanogénétiques bien définis sont les suivants :

La *prunasine* qui existe dans le *Cerasus Padus* ;

La *prulaurasine* est le glucoside des feuilles du *Prunus Laurocerasus* (fig. 51) ; on le considère comme la forme racémique correspondant à la prunasine qui serait la forme dextrogyre ; on a constaté que dans le

Prunus Laurocerasus il existe de la prunase, sans amygdalase ;

La *sambunigrine* se rencontre dans les feuilles du *Sambucus nigra* ; ce serait la forme lévogyre correspondant aux précédentes substances.

On connaît encore les glucosides suivants :

La *durrhine* des graines du *Sorghum vulgare* (Millet) ; par l'action de l'émulsine on obtient du glucose,

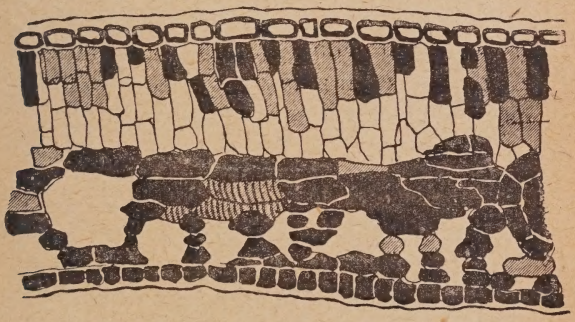


Fig. 51. — Localisation dans la feuille de *Prunus Laurocerasus* du tannin (cellules grises) et de l'acide cyanhydrique (cellules noires).

de l'acide cyanhydrique et de la parahydroxybenzaldéhyde $C^6H^4.OH.COH$.

La *phaséolunatine* des graines de *Phaseolus lunatus* et de Lin ; il donne naissance à du glucose, de l'acide cyanhydrique et de l'acétone.

La *lotusine* observée dans le *Lotus arabicus* est dédoublée par une diastase, la lotase, en glucose, acide cyanhydrique et un pigment jaune, la lotoflavine.

La *vicianine* des graines de *Vicia angustifolia* donne

un disaccharide, le vicianose, de l'acide cyanhydrique et de l'aldéhyde benzoïque.

Il existe en outre toute une série de glucosides cyanogénétiques qui ne sont connus que par le fait du dégagement de l'acide cyanhydrique dans les conditions que nous avons indiquées et qui se rencontrent dans un nombre considérable de plantes appartenant aux familles les plus variées : Aroïdées (*Arum maculatum*), Graminées (*Glyceria aquatica*), Renonculacées (*Aquilegia vulgaris, Thalictrum*), Légumineuses (*Vicia, Lotus*), Grossulariées (*Ribes nigrum, R. rubrum*) Berbéridées, Crucifères, Euphorbiacées, Rhamnées (*Rh. Frangula*), Tiliacées, etc...

Glucosides azotés et sulfurés

Spéciaux aux Crucifères et aux plantes de familles voisines (Capparidées, Tropéolées, Résédacées) ils sont surtout représentés par la sinigrine et la sinalbine, qu'on rencontre chez la Moutarde.

La *sinigrine* ou myronate de potassium existe dans les graines de la Moutarde noire (*Sinapis nigra*), dans celles d'autres espèces de *Sinapis* ainsi que dans la racine de Raifort (*Cochlearia armoracia*). Sous l'action des acides étendus à chaud ou d'une diastase spéciale, la myrosine, à froid, elle est hydrolysée et dédoublée en glucose, essence de Moutarde (isosulfocyanate d'allyle) et sulfate acide de potassium :

$$C^{10}H^{16}AzS^2KO^9 + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^3H^5.CAzS + SO^4KH$$

On peut isoler des graines de Moutarde cette sinigrine, ainsi que la diastase correspondante, la myro-

sine, et montrer, comme avec l'amygdaline et l'émulsine, l'action hydrolysante de cette diastase ; sinigrine et myrosine se trouvent encore dans des cellules différentes, ce qui explique qu'une action mécanique ou chimique (action du chloroforme) soit nécessaire pour que le dédoublement de la sinigrine se produise.

Pour localiser la myrosine on peut encore employer la réaction de Millon ; on constate ainsi (Guignard) que les cellules à myrosine se trouvent disséminées, pour la racine de Raifort, dans tout le parenchyme ligneux, libérien et cortical (fig. 52).

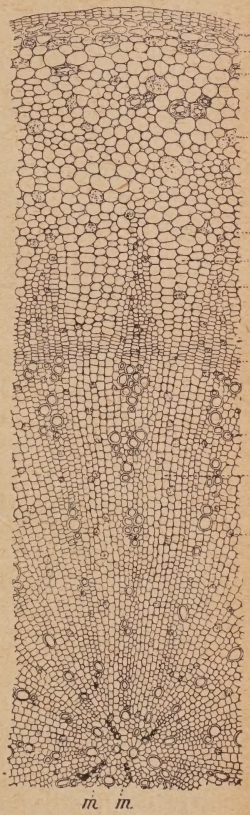


Fig. 52. — Coupe transversale de racine de Raifort ; *d*, cellules à myrosine.

De la sinigrine se rapprochent le glucoside azoté qu'on trouve dans le Navet et qui donne du sulfocyanate de crotoxyle $C^4H^7.CAzS$, celui du *Cochlearia officinalis* aboutissant à du sulfocyanate de butyle

$C^4H^9.CAzS$, celui du *Lepidium sativum* et de la Capucine fournissant de la glucotropœoline.

La *sinalbine* qu'on rencontre dans les graines de Moutarde blanche (*Sinapis alba*) est au contraire assez différente et de structure plus complexe; sous l'action des acides étendus à chaud ou de la myrosine à froid elle se dédouble en glucose, en essence de sinalbine et en un bisulfate de sinapine :

$$C^{30}H^{42}Az^2S^2O^{15} + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^7H^7O.CAzS + C^{16}H^{24}AzO^5.SO^4H$$

Il est généralement admis que l'essence formée a pour formule de constitution

$$C^6H^4.OH.CH^2.CAzS$$

c'est-à-dire qu'elle contient le radical oxytoluyle. De son côté la sinapine est une base qui se décompose facilement en choline $(CH^3)^3 \equiv Az\begin{cases}CH^2.CH^2OH\\OH\end{cases}$ et en un acide sinapine ; la sinapine est ainsi à rapprocher chimiquement du groupe des alcaloïdes.

Signification physiologique des composés cyanogénétiques. — La présence d'une grande quantité d'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* a conduit Treub à une étude d'ensemble relative à la localisation et à la migration de cette substance ; l'auteur arrive à la conclusion que l'acide cyanhydrique se forme dans les limbes foliaires et qu'il est transporté par le liber vers les différents organes de la plante. Si en effet on vient à pratiquer des incisions annulaires intéressant le liber sur des tiges de jeunes pieds on constate que

l'acide cyanhydride s'accumule en grande quantité au-dessus de cette incision, alors qu'il diminue progressivement en dessous, arrivant à disparaître complètement dans la tige et la racine ; la même expérience réalisée sur le pétiole d'une feuille conduit pour cet organe aux mêmes résultats.

Treub a été ainsi amené à émettre l'hypothèse que l'acide cyanhydrique est une substance aux dépens de laquelle se forment les substances protéiques et l'un des premiers produits résultant de l'assimilation de l'azote minéral combiné.

Des individus de *Pangium* cultivés parallèlement, les uns à la lumière, les autres à l'obscurité, se comportent très différemment en ce qui concerne l'acide cyanhydrique ; ce corps subsiste dans les premières plantes alors qu'il disparaît dans les secondes ; celles-ci replacées à la lumière reforment de l'acide cyanhydrique ; la lumière est donc nécessaire à la production de cette substance, qui est utilisée par la plante elle-même.

S'agit-il d'un phénomène lié plus ou moins directement à l'assimilation chlorophyllienne ? Treub a montré que l'acide cyanhydrique disparaît dans les feuilles de *Pangium* qu'on place dans une atmosphère dépourvue de gaz carbonique et se reforme lorsque ces mêmes feuilles sont remises dans une atmosphère normale. Mais répétons sur des feuilles de *Pangium* l'expérience de Sachs relative à l'action de la lumière sur la formation de l'amidon ; soustrayons une partie d'une feuille à l'action de la lumière par du papier d'étain ; après un temps supérieur à celui qui serait nécessaire à la disparition totale de l'acide cyanhy-

drique à l'obscurité on constate que la partie soustraite à la lumière contient autant d'acide cyanhydrique que les parties qui sont restées éclairées ; il n'existe donc pas de relation directe entre la formation de l'acide cyanhydrique et l'assimilation chlorophyllienne, mais ce qui interviendrait ce sont les sucres provenant de cette assimilation.

Quelle est d'autre part l'origine de l'azote de l'acide cyanhydrique formé ? Treub a tout d'abord montré qu'il s'agit d'une substance apportée à la feuille par la sève brute ; si on vient en effet à sectionner la nervure d'un lobe d'une jeune feuille de *Pangium*, on constate que l'acide cyanhydrique disparaît de ce lobe sans se reformer ; d'autre part, alors que les racines donnent les réactions de nitrates, ces réactions ne se produisent plus avec les feuilles. Il y a enfin une concordance entre les cellules basilaires des poils et les cellules à mâcles, dans lesquelles s'emmagasinent des nitrates et où apparaît de l'acide cyanhydrique.

Pour Treub, l'acide cyanhydrique constituerait le premier produit reconnaissable de l'assimilation de l'azote ; il dériverait des nitrates et des sucres ; c'est l'hypothèse qu'avaient déjà émise Pflüger, Latham, A. Gautier.

Un grand nombre de recherches ont porté de même sur la localisation, la migration et l'utilisation possible des composés cyanogénétiques. Treub par exemple a étudié à cet égard le *Phaseolus lunatus* ; cette plante ne contient d'acide cyanhydrique libre que dans les fruits et les graines ; dans les pétioles, les tiges et les racines le corps se trouve combiné à l'état glucosidique qui est considéré par Treub comme une forme de réserve. A

l'obscurité, des dosages portant sur l'acide cyanhydrique libre et la phaséolunatine montrent qu'il y a diminution pour les deux substances (fig. 53), mais elle est plus considérable pour le glucoside.

L'étude des variations de l'acide cyanhydrique dans les feuilles au cours d'une journée a montré que la

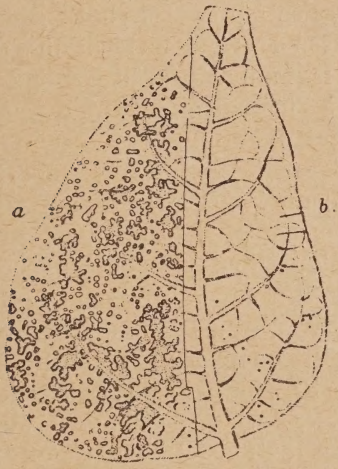


Fig. 53. — Feuille de *Phaseolus lunatus* dont la moitié *a* a été exposée à la lumière, la moitié *b* étant restée à l'obscurité ; la réaction du bleu de Prusse est affaiblie en *b*.

quantité formée dans une journée dépend non pas de l'éclairement du jour même, mais de celui des jours précédents, ce qui met à nouveau en évidence la nature indirecte de la relation qui existe entre cette fonction et l'assimilation chlorophyllienne. L'auteur a pu de plus montrer expérimentalement l'action des sucres ainsi que des nitrates ou des sels ammoniacaux sur la

cyanogénèse du *Phaseolus lunatus* ; il a vu celle-ci augmenter lorsqu'on faisait absorber à de jeunes feuilles, contenant encore peu d'acide cyanhydrique, une solution de sucre (glucose, lactose), de nitrate de potassium ou d'azotate d'ammonium (de 1 à 10 p. 1000).

Des recherches entreprises sur le *Sorghum vulgare* ont fourni à Treub des résultats identiques et l'auteur est arrivé, pour les composés cyanogénétiques et l'acide cyanhydrique, à l'idée qu'on est en présence de substances provenant des nitrates et des sucres, se comportant comme des substances de réserve et aux dépens desquelles peuvent s'édifier les substances protéiques. Mais il faut avouer que, si au point de vue physiologique nous n'observons rien qui s'oppose à cette manière de voir, il peut paraître singulier que la plupart des végétaux soient dépourvus de tels composés, à moins d'admettre que chez eux l'acide cyanhydrique soit engagé de suite dans des combinaisons stables.

D'autre part, les travaux de différents auteurs ont fourni relativement à l'histoire des composés cyanogénétiques des renseignements qui laissent des doutes sur la nature de réserve de ces substances ; c'est ainsi que Guignard, étudiant la cyanogénèse chez le *Sambucus nigra*, a constaté que le glucoside azoté de cette plante apparaît surtout en grande quantité dans les feuilles et qu'il ne s'accumule dans aucun organe de réserve de la plante ; de plus, dans les feuilles âgées, près de leur chute, on trouve presque autant de glucoside que pendant la période la plus active de leur fonctionnement ; d'une manière générale la sambunigrine ne subit au cours du développement, dans les

différents organes, que des variations très faibles ; des faits semblables ont été signalés par GUIGNARD chez le *Passiflora cœrulea*.

L'état de nos connaissances sur les glucosides cyanogénétiques ne nous permet donc pas encore de conclure avec certitude en ce qui concerne le rôle de ces composés et d'ailleurs les données fournies par les méthodes exposées jusqu'ici peuvent toujours prêter à discussion, car on ne met en évidence par les dosages que le phénomène résultant d'une part de la formation et d'autre part de l'utilisation possible des substances envisagées.

Signalons enfin certains faits qui conduisent à considérer l'acide cyanhydrique comme une substance de déchet, provenant de la désagrégation des substances protéiques. GUYOT a cultivé une Mucorinée produisant de l'acide cyanhydrique (1,1 p. 100 de la substance sèche) et pense qu'il s'agit d'un corps résultant de l'aldéhyde formique et de l'ammoniaque formées par la tyrosinase agissant sur les acides aminés ; l'aldéhyde formique donnerait de l'acide formique qui formerait du formiate d'ammonium ; celui-ci aboutirait lui-même à de l'acide cyanhydrique

$$H.CO^2.AzH^4 = CAzH + 2\,H^2O$$

Il faudrait, pour être assuré de la nature de réserve des composés cyanogénétiques, qu'on puisse réaliser le développement d'une plante en lui fournissant comme source unique d'azote un glucoside de cette nature ; cela revient à essayer d'effectuer des cultures pures d'une plante verte en présence du seul aliment azoté envisagé ; COMBES a tenté de telles cultures en

s'adressant à l'amygdaline ; ce glucoside s'est montré nocif pour le Radis qui n'en contient pas ; avec le *Vicia monocarpa* et le *V. sativa*, dont les graines contiennent un composé cyanogénétique, on n'obtient par trace d'absorption d'amygdaline par les racines qui subissent encore un arrêt dans leur développement.

3. Alcaloïdes

Il n'existe pas de définition précise de ce terme ; pris dans son sens le plus large il s'applique aux substances végétales azotées présentant une réaction alcaline ; ainsi compris le groupe des alcaloïdes contient aussi des substances qui se trouvent être communes aux deux règnes, que nous avons vu dériver des substances nucléiques ou que nous verrons résulter des phosphatides (triméthylamine, bétaïne, choline, base puriques). Au sens étroit, le plus ordinairement employé, le mot d'alcaloïde s'applique à des substances azotées hétérocycliques, spéciales aux végétaux, ayant une structure moléculaire relativement complexe, basiques, présentant des actions physiologiques prononcées et variées sur les animaux, et qui sont souvent caractéristiques de certaines familles, genres ou espèces végétales.

Les alcaloïdes sont quelquefois répartis dans toute la plante, mais surtout dans l'écorce, la graine et le fruit ; ils sont dissous dans le suc cellulaire, libres ou à l'état de sels organiques (malates, citrates, tannates, lactates, quinates, méconates).

Ils sont rares chez les Monocotylédones ; certaines familles, telles que les Renonculacées, les Papavé-

racées, les Solanées, les Rubiacées, les Ombellifères en sont très richement pourvues ; d'autres Dicotylédones (Labiées, Rosacées) n'en présentent pas. Il peut en exister plusieurs dans une même espèce (Pavot, Quinquina) et ce n'est que rarement qu'un même alcaloïde se rencontre dans des plantes appartenant à des familles différentes ; il y a cependant des exceptions à cette dernière règle, et elles s'appliquent surtout à la berbérine et à la caféine ; ce dernier corps existe en effet non seulement dans le Caféier (Rubiacées), mais aussi dans le Théier (Ternstrémiacées), le Guarana (Sapindacées), le Maté (Ilicinées), le Colatier (Sterculiacées).

Un alcaloïde peut exister dans certaines espèces et faire défaut dans d'autres, pourtant très voisines, d'un même genre ; c'est ainsi que la caféine, qui existe dans le *Coffea arabica*, fait défaut dans le *C. Humboldtiana*.

Ce sont très ordinairement des corps quaternaires, constitués par du carbone, de l'azote, de l'hydrogène et de l'oxygène ; certains cependant, tels que la nicotine, la conicine, ne contiennent pas d'oxygène.

Propriétés physiques. — Les alcaloïdes sont ordinairement incolores, peu solubles dans l'eau, très solubles dans l'alcool amylique ; à la température ordinaire ils sont le plus souvent solides et plusieurs sont alors sublimables (caféine, aconitine, codéine, morphine, strychnine, brucine) ; certains sont liquides (nicotine, conicine) ; la triméthylamine, si on la comprend parmi les alcaloïdes, est un gaz.

Réactions de précipitation. — Elles sont utilisées pour

établir la localisation des alcaloïdes et certaines pour effectuer leur dosage. Le bichlorure de mercure donne souvent avec les alcaloïdes un précipité blanc cristallin ; l'acide picrique précipite les alcaloïdes en petits cristaux jaunes, le tannin en une substance amorphe ; la solution iodo-iodurée donne naissance à un précipité floconneux rouge brun. On obtient de même des précipités avec les acides phosphomolybdique, phosphotungstique et silicotungstique, avec le permanganate de potassium, le chlorure ferrique...

Une méthode générale de dosage des alcaloïdes consiste à déterminer la quantité de réactif de MAYER (6 gr. 775 de bichlorure de mercure et 25 grammes d'iodure de potassium par litre) nécessaire pour obtenir la précipitation totale des substances en question contenues dans une solution.

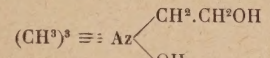
Réaction de coloration. — Il s'agit de réactions spéciales à certains alcaloïdes ; c'est ainsi qu'avec la strychnine, l'atropine, la cocaïne, on obtient une coloration violette en traitant un tissu qui renferme l'une de ces substances par l'acide nitrique, puis par une solution alcoolique de potasse (réaction de VITALIS). L'acide sulfurique concentré, puis l'acide nitrique donnent avec la brucine une coloration rouge intense.

a. Bases aminées

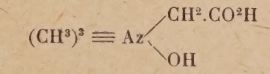
Si on prend le mot alcaloïde dans son sens le plus large, les corps les plus simples qui rentrent dans ce groupe de substances devant leurs propriétés basiques à un groupe azoté, sont les bases aminées et

leurs dérivés, c'est-à-dire l'*ammoniaque*, la *méthylamine* $Az^2.CH^3$ qui existe à l'état libre dans la Mercuriale, la *diméthylamine* $AzH.(CH^3)^2$ qui se rencontre chez les Champignons, la *triméthylamine* $Az.(CH^3)^3$ qui existe par exemple dans le *Chenopodium vulvaria* auquel il donne son odeur fétide.

La *choline* est un dérivé de la triméthylamine qui existe très communément à l'état libre chez les végétaux ; sa formule est :



Nous avons eu déjà l'occasion de parler d'un de ses dérivés par oxydation, la *bétaïne*



qui entre dans la constitution de la *damascénine* et de la *chrysanthémine*. Dérivent aussi par oxydation de la choline la *muscarine*, l'un des principes toxiques de l'*Amanita muscaria* et la *bolétine* du *Boletus Satanas*.

Parmi les diamines viennent se ranger les ptomaïnes, telles que la *putrescine* et la *cadavérine*, qui résultent de la décomposition bactérienne des protéines.

La putrescine qui est une tétraméthylènediamine $AzH^2 — (CH^3)^4 — AzH^2$, provient surtout de l'arginine ; on a isolé de l'*Hyoscyamus muticus* une tétraméthylputrescine

$$(CH^3)^2 = Az — (CH^2)^4 — Az = (CH^3)^2$$

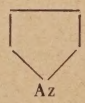
La cadavérine $AzH^2 — (CH^2)^5 — AzH^2$ provient surtout de la lysine.

Trouveraient place ici, si nous ne les avions pas envisagés déjà antérieurement, toute une série de corps, tels que l'urée, la guanidine, l'arginine, la lysine que nous avons vu dériver des substances protéiques ; nous avons la sensation très nette, en ne se plaçant qu'à un seul point de vue chimique, que nous continuons avec les alcaloïdes l'étude des produits de décomposition des protéines.

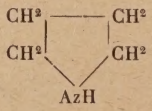
Les bases précédentes peuvent s'unir à un noyau aromatique ; c'est le cas de l'*adrénaline* des capsules surrénales et, parmi les alcaloïdes végétaux, de la *damascénine* du *Nigella Damascena* et de l'*hordénine*, isolée des embryons du malt germé.

b. Alcaloïdes à noyau pyrrol

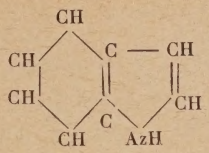
Ce noyau contient un atome d'azote et peut être représenté par le schéma



L'alcaloïde le plus simple de ce groupe est la *pyrrolidine* qui se trouve dans les feuilles de Carotte.



Nous avons déjà vu que se rattache à ce corps l'*indol*

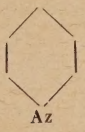


qu'on rencontre dans l'essence des fleurs de Jasmin et des fleurs d'Oranger, ainsi que le *scatol*, qui est un méthylindol et qu'on a signalé dans le bois de *Celtis reticulosa* (Java).

On se rappelle comment le tryptophane, dérivant des protéines, se rattache à l'indol.

c. Alcaloïdes du groupe de la pyridine

Ils ont comme noyau caractéristique celui de la pyridine



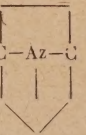
C'est dans cette série que viennent se placer les alcaloïdes du Tabac dont le plus important est la *nicotine* ; elle existe dans tous les organes du *Nicotiana Tabacum*, mais en grande abondance surtout dans les points végétatifs ; on la localise surtout dans les cellules épidermiques de la tige, dans les cellules basales des poils glanduleux ; la teneur des organes en nicotine peut être facilement évaluée par la précipitation de l'alcaloïde à l'aide de l'acide silicotungstique, puis en

déplaçant la nicotine du précipité formé à l'aide de vapeur d'eau et l'évaluant par une solution d'acide sulfurique titré.

Cette même série contient également la *trigonelline* des graines de *Trigonella Fœnum græcum*, la *conicine* du *Conium maculatum*, qui n'est d'ailleurs pas le principe mortel de la Ciguë, lequel ne paraît pas être de nature alcaloïdique, enfin la *pipérine* du Poivre (fruits de *Piper nigrum*, *P. longum*...) ; on peut mettre en évidence ce dernier alcaloïde directement en plaçant à sec des coupes entre lame et lamelle ; l'alcaloïde, contenu dans des cellules jaunes, s'évapore et vient former de petits cristaux par sublimation. On obtient des cristaux plus gros à l'intérieur même des cellules contenant l'alcaloïde en plaçant les coupes dans de la glycérine ou de l'eau où il est presque insoluble. La pipérine se dissout dans l'acide sulfurique en donnant naissance à une coloration rouge sang foncée ; elle est située exclusivement dans le périsperme.

d. Alcaloïdes résultant de la condensation des noyaux pyridine et pyrrol (dérivés cycloheptaniques)

Le type de ce groupe est constitué par l'*atropine* de la Belladone, dont on a pu effectuer la synthèse ; sa structure correspond au schéma suivant



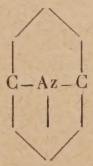
L'atropine existe dans tous les organes de la plante ; elle donne, avec la solution iodo-iodurée, un précipité brun qui, au bout d'un certain temps, acquiert un aspect métallique. Une réaction très sensible de l'atropine qui peut être employée pour la reconnaître, est d'ordre physiologique ; il s'agit de l'action dilatante (action mydriatique) exercée sur la pupille des animaux supérieurs ; elle est encore sensible pour un poids de 0 mgr. 0002 de substance.

Plusieurs autres alcaloïdes fournis par différentes plantes de la famille des Solanées viennent se ranger dans ce groupe ; c'est le cas de l'*hyoscyamine*.

La *cocaïne*, des feuilles de l'*Erythroxylon Coca*, appartient également à cette série.

f. Alcaloïdes résultant de la condensation de deux noyaux pyridine (dérivés cyclooctaniques)

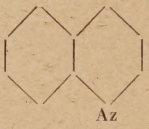
Le schéma de leur structure correspond à la disposition suivante



où les deux noyaux pyridine ont en commun un atome d'azote et les deux atomes de carbone voisins. Tel est le cas de la *pelletiérine*, de l'écorce du Grenadier, et de ses dérivés.

g. Alcaloïde du groupe de la chinoline

Leur structure résulte de la condensation d'un noyau pyridine et d'un noyau benzène



Il s'agit des alcaloïdes contenus dans l'écorce des Quinquinas (*Cinchona*, Rubiacées); les principaux sont la *cinchonine*, la *quinine*, auxquels se rattachent la *strychnine*, la *brucine* et les alcaloïdes du curare.

h. Alcaloïdes du groupe de l'isochinoline

Le noyau caractéristique ne diffère du précédent que par la position de l'atome azote.

Cette série comprend de nombreuses substances se rattachant aux principaux types suivants :

1° La *papavérine*;

2° La *berbérine* qui se rencontre dans des plantes appartenant à des familles assez variées (Berbéridées, Rutacées, Ménispermées, Renonculacées...); elle cristallise en aiguilles d'un brun jaune; en présence d'acide nitrique étendu (2 p. 100) il se forme dans une

coupe de racine de *Berberis vulgaris* un sel correspondant de berbérine ; avec l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique on obtient une réaction semblable ; l'eau de brome forme dans les cellules un précipité rouge amorphe.

3° Les alcaloïdes de l'opium. Cette matière, qui n'est autre chose que le latex coagulé du *Papaver somniferum*, est constituée par des gommes et des résines, des sels, des acides organiques, des matières protéiques et des sucres ; elle contient en outre environ 22 alcaloïdes dont les plus connus sont la *morphine*, la *codéine*, la *thébaïne*.

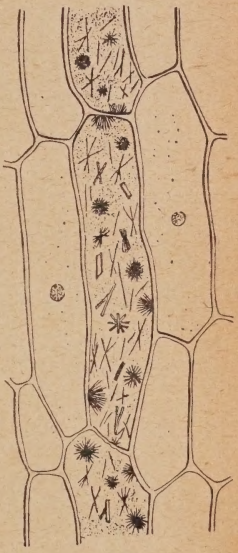


Fig. 54. — Laticifères de *Chelidonium majus* où les alcaloïdes ont été précipités à l'état cristallisé par l'acide chlorhydrique à 10 p. 100.

Les alcaloïdes contenus dans le latex des différentes Papavéracées peuvent être étudiés microchimiquement ; d'après Clautriau les alcaloïdes n'existent pas d'ailleurs que dans le latex et on en rencontre aussi dans l'épiderme, surtout chez le fruit ; les graines en paraissent dépourvues, mais il en apparaît dans les jeunes plantes dès qu'elles ont atteint une longueur de 10 centimètres environ.

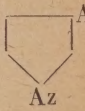
Dans le latex de la chélidoine, il existe également de nombreux alcaloïdes (chélérythrine, chélidonine,

sanguinarine, protopine, homochélidonine...), qui donnent avec l'acide chlorhydrique des sels cristallisant facilement (fig. 54), d'où un moyen d'établir leur localisation.

j. Alcaloïdes à noyaux possédant deux atomes d'azote

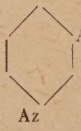
Tous les alcaloïdes des groupes précédents possèdent un ou plusieurs noyaux à un seul atome d'azote; restent ceux qui possèdent un ou plusieurs noyaux à deux atomes d'azote; dans ce dernier groupe on distingue :

1° Les alcaloïdes ayant le noyau imidazol



que nous avons déjà rencontré dans l'histidine et l'allantoïne. C'est le cas des alcaloïdes du jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*) et particulièrement de la *pilocarpine*.

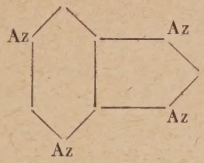
2° Les alcaloïdes possédant le noyau pyrimidine



telle est la *thymine*.

3° Les alcaloïdes ayant à la fois le noyau imidazol

et le noyau pyrimidine, c'est-à-dire rentrant dans la série purique



Il s'agit des bases xanthiques que nous avons déjà envisagées et de leurs dérivés ; c'est ainsi que de la

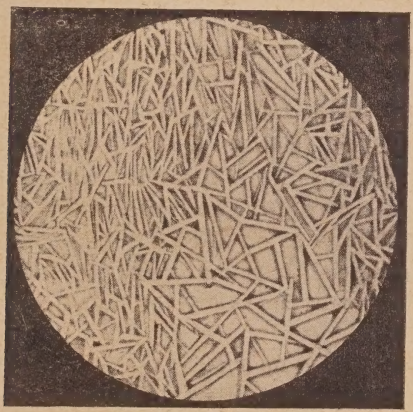


Fig. 55. — Cristaux de caféine obtenus par sublimation à partir des graines de caféier.

xanthine (dioxypurine) dérivent la *théobromine* du Cacao et la *théophylline* qui sont deux diméthylxanthines ; la *caféine* est une triméthylxanthine.

On reconnaît l'existence de la caféine dans un tissu par sublimation (fig. 55) ou par un certain nombre

de réactions chimiques ; c'est ainsi qu'on obtient des cristaux lorsqu'on traite une coupe de grain de café par une goutte d'acide chlorhydrique concentré, puis par une goutte de chlorure d'or à 3 p. 100 ; ces cristaux apparaissent sur les bords du liquide. On reconnaît que la caféine existe dans presque toutes les cellules de l'albumen.

L'un des procédés de dosage de la caféine consiste à extraire l'alcaloïde par le chloroforme ; mais cette substance n'extrait des grains secs de café qu'environ 1/10 de l'alcaloïde qui se trouve en grande partie engagé dans une double combinaison qui n'est autre qu'un chlorure double de potassium et de caféine. Mais si on traite auparavant des graines de café pulvérisées par un peu d'eau on peut extraire la totalité de la caféine en quelques heures à l'aide du chloroforme, en employant un appareil Soxhlet ; après distillation du chloroforme on traite par de l'eau froide qui sépare l'huile et on filtre à travers de l'ouate ; le liquide est repris plusieurs fois par le chloroforme et on distille dans un flacon taré après dessiccation à 100°.

Signification physiologique des alcaloïdes. — Les alcaloïdes ne paraissent pas être utilisables par la plante qui les produit ; c'est en particulier la conclusion à laquelle arrive Clautriau, et elle est surtout basée sur le sort que ces substances subissent après leur formation.

Si on considère par exemple des graines de caféier germant, on contate que la caféine ne subit aucune diminution ; il y a plutôt tendance à l'augmentation de l'alcaloïde, que la germination s'opère à l'obscurité

ou à la lumière ; on n'est donc pas en présence d'une substance de réserve aux dépens de laquelle s'effectue le développement.

La graine du Théier ne présente pas de caféine ; or à partir de la germination cet alcaloïde apparaît, augmente régulièrement, puis ne subit ultérieurement aucune diminution ; ce n'est donc pas non plus ici un aliment pour la plante.

La caféine est d'autre part surtout abondante dans les parties en voie de croissance de la plante, en particulier à l'extrémité des jeunes rameaux ; c'est là qu'elle se forme et non dans les tissus d'assimilation de la plante, et sa formation correspond à l'utilisation des substances protéiques.

Des conclusions analogues s'appliquent à l'atropine, la morphine, la cocaïne. D'autre part quelques recherches consistant à fournir artificiellement à une plante supérieure, en culture aseptique, des alcaloïdes comme source d'azote n'ont fourni que des résultats négatifs ; les corps en question se sont toujours comportés comme des poisons.

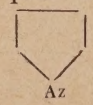
La teneur des plantes en alcaloïdes varie beaucoup avec les conditions extérieures ; la caféine est en quantité très variable avec le climat ; il peut même arriver, dans certains cas, qu'un alcaloïde vienne à faire défaut dans une espèce qui en est ordinairement pourvue ; c'est le cas pour la Grande Ciguë qui ne contient pas trace de conicine en Ecosse.

Se plaçant à un autre point de vue, celui de l'origine des alcaloïdes, Ciamician et Ravenna (1913) ont recherché si certaines substances organiques, injectées au Datura ou au Tabac, n'auraient pas une action sur

la teneur de ces plantes en alcaloïdes. Ils ont constaté que la pyridine, la pipéridine et le carbopyrrolate de sodium augmentent les proportions d'alcaloïdes dans le Datura et les deux premières substances dans le Tabac. Les matières injectées disparaissent assez rapidement ; c'est ainsi que 1100 grammes de tartrate de pyridine ont été introduits dans 90 plantes de Tabac ; il n'en restait plus que 8 grammes à la fin de l'expérience et la teneur en nicotine était passée de 1,5 à 2,2 p. 1000. Mais il convient de remarquer qu'il ne s'agit pas là d'une action étroitement spécifique ; le tartrate d'ammonium, l'asparagine, l'acide benzoïque, l'hydroquine et le glucose présentent une action semblable.

D'après tout ce qui précède, on est arrivé à considérer les alcaloïdes comme des substances de déchet et à rechercher leur origine dans la transformation des substances protéiques, la caféine et les alcaloïdes voisins provenant plus particulièrement des nucléines dont elles possèdent le noyau purique.

Presque tous les noyaux des différents alcaloïdes se retrouvent dans les produits de désagrégation des protéines, ainsi que la classification des alcaloïdes nous l'a montré ; il y a cependant une exception qui se rapporte au noyau pyridique des alcaloïdes du Poivre, de la Ciguë... Ce noyau n'existe ni dans les protéines, ni dans les nucléines, ni dans la chlorophylle, ni enfin dans les lécithines que nous envisagerons plus loin. Mais l'expérience montre que le



se transforme facilement en dérivés

pyridiques par l'adjonction d'un 5e atome de carbone. Cette manière de voir est corroborée par le fait que certains alcaloïdes ont un noyau pyrrolique et un noyau pyridine associés (atropine, cocaïne) et que dans certaines plantes on trouve à la fois des bases à noyau pyridique et d'autres à noyau pyrrolique.

D'après Pictet il faudrait chercher l'origine de ce 5e atome de carbone dans l'aldéhyde formique, premier produit de la synthèse de l'assimilation chlorophyllienne, qui se comporterait comme agent méthylant ; il transformerait ainsi le noyau pyrrolique en noyau pyridique, comme il méthylerait d'autre part divers alcaloïdes. On a remarqué en effet que les alcaloïdes d'une même plante peuvent être rangés en séries homologues où différents atomes d'hydrogène sont remplacés par autant de radicaux CH^3 ; c'est ainsi que la conicine est associée à la méthylconicine, la morphine à la codéine, qui est une méthylmorphine. Nous devons cependant pour terminer signaler certaines hypothèses suivant lesquelles les alcaloïdes, tout en provenant des substances protéiques, joueraient un certain rôle dans la biologie des végétaux qu'ils produisent et atténueraient la nature de déchet que nous leur avons précédemment attribuée.

La localisation assez fréquente des alcaloïdes dans l'épiderme, leur accumulation dans le tégument de la graine les a fait regarder par certains auteurs comme des agents de protection, au même titre d'ailleurs que les composés cyanogénétiques, contre l'attaque des herbivores ou des insectes ; cette conception a le tort d'être d'un finalisme par trop simple, de supposer que les actions des alcaloïdes sont les mêmes

sur tous les animaux et se trouve d'ailleurs démentie par les faits ; car les plantes à alcaloïdes ont autant de parasites animaux que les autres ; de plus toutes ces considérations de nature finaliste ont le grave inconvénient, en dehors de leur caractère un peu puéril, d'amener des contradictions par trop évidentes, car les plantes ne peuvent à la fois être faites pour nourrir les animaux et les empoisonner.

D'autre part certains auteurs attribuent aux alcaloïdes un rôle d'excitation dans certains phénomènes physiologiques ; d'après les recherches de Wottschal, la solanine se formerait en abondance dans le voisinage d'une section d'un tubercule ; ce serait elle qui provoquerait une augmentation du phénomène respiratoire et la transformation des matériaux cellulaires utilisés dans la cicatrisation ; mais on peut tout aussi bien admettre que la formation de solanine n'est qu'une conséquence de la transformation plus active des matières protéiques prenant part au phénomène de cicatrisation.

Dans un mémoire récent, Ciamician et Ravenna sont revenus sur la question du rôle possible des alcaloïdes ; ils ne voient pas en elles des matières de déchet définitif, du fait qu'elles existent souvent dans la graine ; ils ne les considèrent pas non plus comme des matériaux de réserve à cause de leur faible proportion, de leur constitution, de leurs propriétés chimiques et d'expériences directes ; les auteurs se demandent si ces substances ne joueraient pas chez les végétaux le même rôle que celui qui revient chez les animaux aux matières excitatrices ou modératrices qui assurent chez ces derniers l'équilibre fonctionnel ;

les chimistes italiens émettent l'hypothèse que les alcaloïdes constitueraient pour les végétaux de véritables *hormones* ; cette manière de voir est basée sur l'action qu'exercent les alcaloïdes sur les plantes auxquelles on les fait absorber et sur les relations existant entre cette action et la constitution chimique des matières envisagées ; des expériences ont été faites surtout sur le Haricot dont les plantules étaient arrosées avec des solutions à 1 p. 1000 des subtances à étudier.

Il arrive fréquemment que les alcaloïdes déterminent chez les feuilles une coloration verte plus intense et des mesures directes permettent de s'assurer qu'il s'agit d'une production plus considérable de chlorophylle ; de plus, et c'est le cas pour la théobromine et la caféine, on voit se produire une plus grande quantité d'amidon et par suite une augmentation sensible du poids des feuilles ; il semble bien d'ailleurs qu'il s'agisse ici d'un arrêt dans la migration de l'amidon.

Ciamician et Ravenna ont obtenu également des effets nettement spécifiques avec la nicotine ; toxique cet alcaloïde détermine, après la chute des premières feuilles simples, un albinisme des feuilles trifoliolées, qui apparaissent marquées de blanc ou de jaune pâle, comme les feuilles de Houx panaché. Au cours de ces expériences il est apparu un fait général touchant la toxicité des alcaloïdes vis-à-vis des végétaux ; celle-ci augmente toujours par l'introduction de radicaux alcooliques ou acides, d'oxydryles, de restes aminés ou iminés. C'est ainsi que la caféine, dérivé triméthylé de la xanthine, est beaucoup plus toxique que cette

dernière substance ; la théobromine, diméthylxanthine a une action intermédiaire ; il en est de même pour les dérivés méthylés de l'ammoniaque dont la toxicité croît avec le nombre des radicaux méthyle ; l'acide méthylurique est vénéneux alors que l'acide urique est inoffensif. Des faits analogues s'observent pour les dérivés de pyridine et de la pipéridine ; de son côté la morphine n'apparaît pas toxique, alors que la codéine ou méthylmorphine agit comme un poison.

Les substances alcaloïdiques les plus simples, subissant ainsi des phénomènes de substitution qui accroissent leur toxicité, il paraît difficile à Ciamician et Ravenna de les considérer comme des matières de déchet ; elles devraient en effet dans ce cas subsister telles quelles ; devenant de plus en plus actives il est naturel de leur attribuer un rôle particulier dans le fonctionnement des végétaux.

Nous nous sommes contentés de signaler les différentes idées qui ont été successivement émises touchant le rôle physiologique des alcaloïdes ; il faut bien avouer qu'il règne encore une grande incertitude à ce sujet.

4. Lipoïdes azotés et phosphorés

A la suite des substances grasses végétales ordinaires, les huiles, nous avons signalé l'existence de toute une série de matières qu'on désigne sous le nom général de *lipoïdes*, parce qu'elles présentent une série de caractères que nous avons reconnus aux substances grasses : réfringence, nature des solvants (l'éther en particulier). Nous avons déjà rangé dans

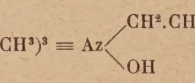
cette catégorie les *cholestérines* végétales qui sont des corps ternaires ; il nous reste à envisager les lipoïdes qui contiennent en outre dans leur molécule de l'azote et du phosphore ; il s'agit d'une part des *phosphatides*, qui comprennent les lécithines et les lécithides, et d'autre part de la *phytine*.

a. Phosphatides

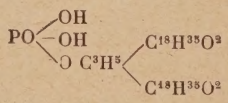
Les plus simples sont constituées par les *lécithines* ; il s'agit de substances qui sont solubles dans l'alcool et dans l'éther, et qu'on se trouve par suite extraire en même temps que les matières grasses lorsqu'on utilise ce dernier solvant ; elles ont un aspect cireux et se comportent comme des colloïdes se gonflant dans l'eau ; observées en lumière polarisée elles présentent le phénomène de la croix noire (fig. 56). Leur composition chimique les rapproche aussi des matières grasses proprement dites ; car elles ne sont autre chose que des éthers de la glycérine, dans lesquels interviennent encore les mêmes acides gras. Traitées par les alcalis ou les acides étendus à chaud ou par la lipase à froid, elles donnent naissance à de l'acide glycérophosphorique $PO\begin{matrix}OH\\OH\\O.C^3H^5(OH)^2\end{matrix}$,

Fig. 56. — Grains de lécithine observés à la lumière polarisée.

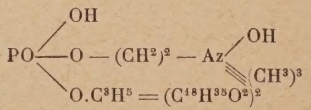
un ou deux acides gras tels que l'acide stéarique, palmitique, oléique, et de la choline dont la formule, on se le rappelle, est



nous sommes par suite amenés à considérer les lécithines comme des glycérophospho-stéarates, palmitates, oléates de choline ; s'il s'agit par exemple d'acide stéarique, on peut concevoir la synthèse d'une lécithine comme il suit ; il se forme tout d'abord un éther distéarique de l'acide glycérophosphorique, soit



par combinaison avec la choline on obtient enfin une lécithine



qui possède une fonction acide et quatre fonctions éther.

Les différentes lécithines diffèrent par la nature de l'acide gras qui intervient ; les deux restes qui sont soudés au reste de la glycérine peuvent être d'ailleurs de nature différente ; on a de la sorte des lécithines distéarique, dipalmitique, dioléique, palmitostéarique, oléostéarique, oléopalmitique ; il en résulte que la teneur en phosphore est légèrement variable d'une espèce de lécithine à une autre (de 3,69 à 4,12 p. 100).

Si on réduit des graines en poudre et qu'on les traite par l'éther qui dissout les substances grasses et les lécithines, puis qu'on reprenne par de l'alcool absolu bouillant, on extrait une nouvelle quantité de lipoïdes qui, sous l'action des acides dilués bouillants, donnent les mêmes produits de décomposition que les lécithines, mais en outre des sucres réducteurs, hexoses ou pentoses, dans la proportion d'environ 16 p. 100, ou même d'autres substances telles que des glucosides, des alcaloïdes et peut-être des substances protéiques ; il s'agit de combinaisons de lécithines avec ces différents corps et on les désigne sous le nom de *lécithides* ; elles sont aux lécithines simples ce que sont les protéides aux protéines.

Ces lécithides sont précipitées de leurs solutions alcooliques par le chlorure de cadmium, le chlorure de platine, l'acétate de plomb, l'acétone.

L'ensemble des phosphatides est répandu d'une manière très générale dans tout le règne végétal ; on les a particulièrement étudiées dans les graines où leur taux est de 0,25 à 1,7 p. 100 de substance sèche ; leur proportion ne paraît avoir aucune relation avec le taux des matières grasses, mais plutôt avec la richesse en substances protéiques, comme cela paraît ressortir du tableau suivant (Stoklasa) :

	Substances grasses	Protéines	Lécithines
	—	—	—
Blé	1,85	12,04	0,65
Maïs	4,36	9,12	0,28
Lupin jaune	4,38	38,25	1,59
Soja	14,03	38,12	1,64
Chanvre	32,58	18,23	0,25
Œillette	40,79	19,53	0,88

L'embryon est ordinairement plus riche en phosphatides que l'albumen ; dans le Blé, par exemple, sa teneur est de 1,55 dans l'embryon alors que la teneur moyenne de l'amande n'est que 0,65.

Lors de la germination effectuée à la lumière, la quantité de phosphatide augmente d'une manière régulière : pour la Betterave elle passe de 0,45 p. 100 à 5,22 p. 100 au bout de cinq jours ; c'est l'inverse qui se produit à l'obscurité ; si on considère par exemple des plantules étiolées de Vesce, on voit (Prianichnikov) qu'au bout de dix jours elles ne contiennent que 0,58 p. 100 de phosphatides alors qu'il en existait 1,08 p. 100 dans la graine.

Si on dose les différentes formes de phosphore dans les graines de Fève et dans les plantules étiolées correspondantes, on trouve (Iwanoff) les résultats qui suivent, rapportés à 100 de phosphore total :

		Plantules de	
	Graine	5 jours	20 jours
	—	—	—
Phosphore inorganique .	11,4	48,1	80,2
— des lécithines.	11,6	—	6,6
— des protéines .	52,5	37,4	13,7
— organique . .	25,7	9,8	5,1

On voit que c'est surtout le phosphore engagé dans les protéines qui s'est transformé en phosphore inorganique et que le phosphore des lécithines n'a subi qu'une modification beaucoup moins accentuée.

On rencontre également des phosphatides dans les organes souterrains de réserve, (c'est le cas pour les racines de Betterave, de Carotte, de Guimauve, dans les bourgeons et les feuilles ; on en observe par exemple

0, 46 p. 100 dans les bourgeons et 0,94 p. 100 dans les jeunes feuilles de Marronnier d'Inde.

Les fleurs en contiennent généralement peu, si on fait exception pour le pollen qui en est au contraire abondamment pourvu (6,04 p. 100 dans le pollen de la Betterave); les gousses jeunes des Légumineuses en contiennent également une forte proportion (3,8 p. 100 chez le Pois, 6,5 p. 100 chez le Haricot).

Les Champignons de tous les groupes présentent également des phosphatides; les teneurs sont de l'ordre suivant :

Psalliota campestris (chapeau). . . .	0,32	p. 100
Boletus edulis — . . .	1,94	—
Amanita Muscaria — . . .	7,42	—
Levure.	0,31	—

Il en est de même pour les Bactéries.

Nous sommes d'ailleurs très mal renseignés sur le rôle physiologique de ces substances ; Overton a pensé que c'étaient elles qui donnaient à la membrane cytoplasmique ses qualités particulières de perméabilité ; Palladine a vu en elles des substances jouant un rôle de fixation de l'oxygène dans le phénomène respiratoire ; Loew a pensé également que la combustion des substances grasses ne s'effectuait que lorsqu'elles étaient passées à l'état de phosphatides.

Il nous reste à signaler l'existence d'une matière lipoïdique à la fois azotée et phosphorée, qu'on a désignée sous le nom de *phytine* et qui existe à l'état d'une combinaison avec le calcium et le magnésium ; il s'agit d'un éther hexaphosphorique de l'inosite ; on se rappelle que ce dernier corps est un alcool polyatomique cyclique $C^6H^6(OH)^6$; on a réussi (Pos-

TERNAK) à effectuer la synthèse de la phytine à partir de l'inosite, de l'acide phosphorique, du calcium et du magnésium. Elle constituerait une matière de réserve qui ne serait autre chose que la substance fondamentale des *globoïdes* des graines d'aleurone et il existerait une diastase, la phytase, capable de la dédoubler.

La phytine contient 80 p. 100 du phosphore total des graines de Légumineuses, 95 p. 100 des graines de Moutarde, 43 p. 100 de Ricin.

Cycle du phosphore

Après avoir envisagé assez longuement le cycle biologique du carbone, puis celui de l'azote, et montré comment ces deux éléments sont utilisés par les plantes supérieures sous des formes relativement simples, le gaz carbonique pour le premier, l'ammoniaque et l'acide nitrique pour le second, comment ils forment à l'intérieur des végétaux des composés qui peuvent être très complexes, comment enfin la matière organique, une fois morte, est désintégrée et retourne aux formes simples initiales, il y aurait lieu de faire la même étude pour tous les éléments qui interviennent d'une manière nécessaire dans la nutrition de la matière vivante ; nous ne pourrions le faire que d'une manière fragmentaire pour la plupart d'entre eux ; on peut du moins, pour terminer cette étude, tracer les grandes lignes d'un tel cycle en ce qui concerne le phosphore, dont nous venons de considérer quelques-unes des combinaisons organiques ; les travaux de STOKLASA nous ont apporté en particulier sur ce sujet d'importantes données.

Rappelons que le phosphore existe tout d'abord dans le sol à l'état de combinaisons minérales ; il s'agit des phosphates de calcium, de magnésium, d'aluminium, de fer et de manganèse ; ils sont surtout représentés par des phosphates tribasiques qui ont la propriété d'être absolument insolubles, par conséquent incapables de pouvoir être absorbés par les végétaux ; seule une petite portion du phosphore minéral qui se trouve dans la terre est représentée par des sels solubles ; ce sont des phosphates alcalino-terreux monobasiques ou des phosphates alcalins, (de potassium, de sodium ou d'ammonium) provenant des excréments des êtres vivants ou de la décomposition de leurs cadavres.

D'autre part la composition chimique du sol est telle que l'acide phosphorique y existant à l'état soluble tend constamment à y être ramené à l'état insoluble, en particulier sous l'action du carbonate de calcium ; c'est d'ailleurs ce qu'on observe quand on incorpore à de la terre comme engrais du superphosphate ; celui-ci est rapidement ramené à l'état de phosphate tricalcique. Mais il existe, à côté de ce phénomène, un autre processus tendant au contraire à solubiliser constamment dans le sol une certaine quantité de phosphate ; il s'agit d'un processus biologique, celui du dégagement, du fait de la respiration, de quantités assez considérables de gaz carbonique dans le sol, que ce soit l'œuvre des racines des plantes supérieures ou de microorganismes aérobies ou anaérobies.

L'intensité de cette respiration dépend naturellement de l'aération du sol ; 1 kilo de terre de prairie

non cultivée dégage, suivant la profondeur, des quantités (mgr.) de gaz carbonique de l'ordre des nombres transcrits ci-dessous :

Profondeur (cm.)	CO^2 (mgr.)
10-30	18
30-50	9
50-80	3
80-100	2

Ces nombres se trouvent sensiblement doublés après un labour. Cet acide carbonique transforme lentement les phosphates insolubles en sels solubles ; une part revient d'ailleurs dans cette transformation aux acides organiques (formique, acétique, lactique, butyrique, valérianique...), résultant de la dégradation des sucres simples ou des polysaccharides : cellulose, amidon, composés pectiques, galactanes, pentosanes, matière humique ; les phénomènes de la respiration et de fermentations variées offrent donc un premier exemple d'intervention de réactions biologiques dans l'utilisation des substances phosphorées minérales.

D'autre part, les racines des plantes supérieures et les microorganismes du sol peuvent intervenir pour rendre le sol acide par suite d'une élection qualitative des composants de certains sels ; c'est ainsi que le sulfate d'ammonium est surtout utilisé par son ammoniaque et il s'accumule par suite de l'acide sulfurique libre qui est capable de solubiliser les phosphates insolubles dans l'eau pure.

Mais il existe dans le sol d'autres formes de matières phosphorées ; il s'agit des substances complexes que nous avons vu se constituer dans les végétaux à partir des phosphates, les nucléoprotéides, les phosphatides

et la phytine. Stoklasa a pu estimer à 18-34 milligrammes la quantité de phosphore ainsi engagé dans de telles combinaisons organiques pour 1 kilo de différentes sortes de terres. Ces substances sont décomposées par diverses bactéries et l'acide phosphorique qui en provient est, pour une partie, utilisé comme aliment des cellules qui se constituent et reste, par une autre, en liberté dans le sol, pouvant être absorbé par les plantes supérieures.

S'il s'agit de lécithines, la choline donne naissance, lors de sa décomposition, à du gaz carbonique, de l'ammoniaque et du méthane et l'acide glycérophosphorique est ramené à ses constituants, la glycérine servant d'aliment carboné. Avec les nucléoprotéides il y a également formation d'acide phosphorique en même temps qu'apparition de corps ternaires et de bases xanthiques se comportant comme alimentaires pour les bactéries.

Les organismes hétérotrophes vivant dans le sol ramènent donc à la forme d'acide phosphorique le phosphore engagé dans les combinaisons organiques complexes élaborées par les végétaux et ainsi se trouve fermé le cycle biologique du phosphore.

La valeur alimentaire des composés phosphoorganiques est facilement démontrée pour diverses bactéries (*Bacillus mycoïdes, Bacillus subtilis...*) dont on peut réaliser des cultures pures en leur fournissant comme unique source de phosphore de la lécithine par exemple ; celle-ci disparaît peu à peu alors qu'on met en évidence dans le liquide des quantités croissantes d'acide phosphorique.

On peut encore se rapprocher davantage des condi-

tions réalisées dans le sol en préparant un milieu minéral dépourvu d'azote et de phosphore, additionné de sucre et auquel on incorpore une membrane d'*Azotobacter* provenant d'une culture jeune de cette bactérie ; après l'avoir stérilisé on l'ensemence de *Bacillus mycoïdes* ; ce microorganisme s'y développe bien et on voit encore s'accumuler dans le liquide de l'acide phosphorique qui provient, ainsi que l'azote assimilé, des composés organiques accumulés dans les cellules d'*Azotobacter*.

On pourrait compléter cette expérience en montrant que sur le sol final il serait possible de réaliser la culture d'une plante supérieure, alors que la chose serait impossible sur le milieu initial, et on aurait ainsi une image complète, à propos de l'azote et du phosphore, du rôle qui jouent les microorganismes dans le développement des végétaux supérieurs.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ABDERHALDEN. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 3e éd., Berlin, 1914.

ABDERHALDEN. *Handbuch der biochem. Arbeits-Methoden*, Berlin.

ANDRÉ (G.). 1. — Sur l'élaboration de la matière azotée dans les feuilles des plantes vivaces. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXLVIII, 1909, p. 1685.

2. — *Chimie agricole.* I. *Chimie végétale*, 2e éd., Paris, 1924.

BACH (A.). 1. — Sur le mécanisme chimique de la réduction des azotates et de la formation des matières azotées quaternaires chez les plantes. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXXII, 1896, p. 1499.

2. — Ueber die Wirkung der Tyrosinase. *Ber. d. d. chem. Ges.*, t. XLI, 1908.

BAUDISCH. Ueber Nitrat und Nitrit Assimilation. *Ber. d. Chem. Ges.*, t. XLIV, 1911, p. 1009.

BEIJERINCK (M.-W.). 1. — Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Ztg.*, t. XLVI, 1888, p. 725.

2. — Künstliche Infection von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicicola. Bot. Ztg.*, t. XLVIII, 1890, p. 837.

3. — Ueber oligotritrophile Mikroben. *Cbl. f. Bakter*, II, t. VII, 1901, p. 561.

BERTHELOT (M.) et ANDRÉ (G.). Sur la transformation du salpêtre dans les végétaux. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. IC, 1884, p. 683.

Berthelot (M.). 1. — Fixation de l'azote atmosphérique sur la terre végétale. *Ann. Chim. et Phys.*, 6e série, t. XIII, 1888, p. 5.

2. — Expériences nouvelles sur la fixation d'azote. (*Ann. de Chim. et Phys.*, 6e série, t. XVI, 1889 et t. XXX, 1893.)

Borodin (J.). Ueber die physiologische Rolle und die Verbreitung des Asparagins im Pflanzenreiche. *Bot. Ztg.*, t. XXXVI, 1878, p. 800.

Bouilhac (R.). Sur la fixation de l'azote atmosphérique par l'association des Algues et des Bactéries. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXXIII, 1896, p. 828.

Bouilhac et Giustiniani. Sur une culture de Sarrasin en présence d'un mélange d'Algues et de Bactéries. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. XCXXVII, 1903, p. 1274.

Boullanger. 1. — La nitrification. *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, 1904, p. 841.

2. — L'assimilation de l'azote libre par les microbes. *Bull. Inst. Pasteur*, t. VI, 1908, p. 1.

Boussingault. 1. — *Mémoires de chimie agricole et physiologie.* Paris, 1854.

2. — *Recherches sur la végétation, agronomie, chimie agricole et physiologie,* Paris, 1860.

3. — *Agronomie, chimie agricole et physiologie.* Paris, 1886-91.

Bristol (M.) and Page (H.). A critical Enquiry into the alleged fixation of nitrogen by green Algæ. *Ann. of. appl. Biology*, t. X, 1923.

Butkewitsch (W.). 1. — Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwickelung. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXXVIII, 1903, p. 147.

2. — *Die regressive Metamorphose der Eiweisskörper*, 1904.

3. — Das Ammoniak als Umwandlungsprodukt Stickstoffhaltigerstoffe in höheren Pflanzen. *Biochem. Zeitschr.*, t. XVI, 1909, p. 411.

CATHCART (M.-D.). *The physiology of protein metabolism.* Londres, 1912.

CHARPENTIER (P.-G.). Alimentation azotée d'une Algue, le *Cystococcus humicola. Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, 1903, p. 321.

CIAMICIAN (G.) e RAVENNA (C.). Sul significato biologico degli alcaloidi nelle piante. *Bioch. e terap. sperim.*, t. IX, 1922, p. 3.

CLAUTRIAU (G.). 1. — Localisation et signification des alcaloïdes dans quelques graines. *Ann. Soc. Belge microsc.*, t. XVIII, 1894, p. 34.

2. — *Nature et signification des alcaloïdes végétaux.* Bruxelles, 1900.

3. — Recherches microchimiques sur la localisation des alcaloïdes dans le *Papaver somniferum. Rec. Inst. bot. Bruxelles*, t. II, 1906, p. 237.

COMBES (R.). Recherches biochimiques expérimentales sur le rôle physiologique des glucosides. *Rev. gén. Bot.*, t. XXIX et XXX, 1917 et 1918.

CZAPEK (F.). *Biochemie der Pflanzen*, 2e éd., 1913.

DARWIN (Ch.). *Les plantes insectivores.* Trad. BARBIER, Paris, 1877.

DAVIDSON (J.). Is gaseous nitrogen a product of seedling metabolism ? *Bot. Gaz.*, 1923, t. LXXVI, 95.

DEWÈVRE (A.). Recherches physiologiques et anatomiques sur le *Drosophyllum lusitanicum. Ann. Sc. Nat., Bot.*, t. LXVI, 1895.

DUBOIS (R.). La question des plantes carnivores et les « fleurs de l'air ». *Science et Vie*, 1920.

DUCLAUX (E.). *Traité de micrologie*, t. II, Diastases, toxines et venins, 1899.

DUMONT (J.). Influence des diverses radiations lumineuses sur la migration des albuminoïdes dans le grain de Blé. *C. R. Ac. Sc. Paris*, 30 oct. 1905, 24 déc. 1906.

Ehrlich (F.). 1. — Ueber die Entstehung des Fuselöles *Zeitschr. Verein. d. d. Zuckerindustrie*, t. LV, 1905, p. 539.

2. — Die Rolle des Eiweisses und der Eiweissabbauprodukte bei der Garung. *Jahrb. Versuchst. f. Brauerei in Berlin*, t. X, 1907, p. 515.

3. — Ueber die Bildung des Plasmaeiweiss bei Hefen und Schimmelpilzen. *Biochem. Zeitschr.*, t. XXXVI, 1911, p. 477.

Embden (G.) u. Schmitz (E.). Ueber synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. *Biochem. Zeitschr.*, t. XXIX, 1910, p. 423 et t. XXXVIII, 1912, p. 393.

Fischer (A.). *Vorlesungen über Bakterien*. Jena, 1897.

Foerster (O.). Zur Bestimmung der Salpetersäurestickstoffes nach Kjeldahl'sche Methode. *Chem. Ztg*, t. XII, 1889, p. 1555.

Fosse (R.). Urée dans la nature. *Ann. d. Chimie*, 9e série, t. VI, 1916, p. 13.

França (C.). Recherches sur le *Drosophyllum lusitanicum* Link et remarques sur les plantes carnivores. *Arch. portug. Sc. biolog.*, t. I, 1922.

Frank (B.). 1. — Ueber den experimentallen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffer durch Erdbewohnenden Algen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 34.

2. — Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 332.

3. — Die bisher erzielten Ergebnisse der Nitraginimpfung. *Landw. Versuchst.*, t. LI, 1899, p. 441.

Gerber (C). Les présures végétales. *Rev. Scient.*, 1910, p. 195.

Godlewski. O nitryfikacyi amoniaku. Cracovie, 1896. *Bull. Acad. Cracovie*, 1903, p. 313.

Grandeau (L.). *Nutrition de la plante*. Paris, 1879.

Greshoff (M.). The distribution of Prussic Acid in the vegetable Kingdom. *Rep. Brit. Assoc.*, 1906, p. 138.

GRIMBERT (L.). Les bactéries dénitrifiantes et le mécanisme de la dénitrification. *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, 1904, p. 937.

GUÉRIN (P.). Les plantes à acide cyanhydrique. *Rev. Scient.*, 5e série, t. VIII, p. 65.

GUIGNARD (L.). 1. — Sur la localisation des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *Journ. de Botan.*, 1890.

2. — Sur la localisation des principes qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXI, 1890, p. 249.

3. — Sur quelques propriétés chimiques de la myrosine. *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XLI, 1894, p. 418.

4. — Sur l'existence dans le Sureau noir d'un composé fournissant de l'acide cyanhydrique. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXLI, 1905, p. 16.

5. — Nouvelles observations sur la formation et les variations quantitatives du principe cyanhydrique du Sureau noir. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXLI, 1905, pp. 1193, 1201.

6. — Sur la métamorphose des glucosides cyanhydriques pendant la germination. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXLVII, 1908, p. 1023.

GUYOT (H.). Un champignon à acide cyanhydrique et à aldéhyde benzoïque. *Bull. Soc. bot. Genève*, 2e série, t. VIII, 1916.

HANSTEEN (B.). Ueber Eiweisssynthese in grünen Pflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.*, t. XXXIII, 1899, p. 417.

HARDEN (A.). *La fermentation alcoolique*. Trad. SCHŒFFER, Paris, 1913.

HARTIG (Ph.). *Entwickelungsgeschichte des Pflanzenkeims*. 1858.

HEINZE (B.). Ueber die Stockstoffassimilation durch niedere Organismen. *Landw. Jahrb.*, t. XXXV, 1906, p. 889.

HELLRIEGEL (H.). Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanzen zu gebote ? 59e *Versamml. d. Naturf. u. Aerzte zu Berlin*, 1886.

HELLRIEGEL (H.) u. WILFARTH (H.). 1. — Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. *Zeitschr. Ver. Rübenzucker Ind. d. d. Reichs*, 1888, pp. 1-234.

2. — Recherches sur la nutrition azotée des Légumineuses. (*Trad. dans les Ann. Sc. Agronom.*, 1888).

3. — Erfolgt die Assimilation des freien Stickstoffs durch die Leguminosen unter Mitwirkung niederer Organismen ? *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 138.

HENRY (Ed.). 1. — La forêt accumulatrice d'azote. *Ann. Sc. agron. fr. et étrang.*, t. II, 1897 et 1903.

2. — Sur une théorie nouvelle de la captation de l'azote atmosphérique par les plantes. *Ann. Sc. agron. fr. et étrang.*, 3e série, t. I, 1909.

HENRY (T.-A.). *The plant Alkaloids*. Londres, 1913.

HETTLINGER (A.). Influence des blessures sur la formation des matières protéiques dans les plantes. *Rev. gén. Bot.*, t. XIII, 1901, p. 248.

HIESTAND (O.). *Historische Entwickelung unserer Kentnisse über die Phosphatide Beiträge zur Kentniss der pflanzlichen Phosphatide*. Zürich, 1906.

IVAR BANG. Biochemie der Zelllipoide. *Ergebnisse der Physiol.*, t. VI, 1907, p. 138 et t. VIII, 1909, p. 463.

IWANOFF (L.). 1. — Das Auftreten und Schwinden von Phosphoverbindungen in der Pflanze. *Jahrb. wiss. Bot.*, t. XXXVI 1901, p. 355.

IWANOFF (M.). 2. — Versuche über die Frage, ob in den Pflanzen bei Lichtabschluss Eiweisstoffe sich bilden *Landw. Versuchsstat.*, t. LV, 1901, p. 78.

IWANOFF (L.). 3. — Ueber die Umwandlungen des Phosphors beim Keimen der Wicke. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XX, 1902, p. 366.

4. — *Die Umwandlungen des Phosphors in Pflanzen im Zusammenhang mit den Umwandlungen der Eiweisstoffe*, 1905.

Iwanoff (L) 5. — Ueber synthetische Prozesse der Hefeautolyse. *Biochem. Zeitschr.*, t. LXIII, 1914, p. 359.

Jamieson (Th.). Utilisation of nitrogen in air by plants *Agric. Research Assoc.*, 1905-1908.

Javillier (M.). *Contribution à l'étude de la présure chez les végétaux.* Thèse Pharm. Paris, 1903.

Jodlbaur (M.). Die Bestimmung des Stickstoffs in Nitraten nach der Kjeldahl'schen Methode. *Chem. Zentrbl.*, 1886, p. 433.

Jorissen (A.). L'acide cyanhydrique chez les végétaux. *Bull. Acad. r. de Belg.*, 1913, p. 1202.

Jost (W.). *Vorlesungen über Pflanzenphysiologie.* Jena, 1908.

Karapetoff (M^lle H.) et Sobachnikoff (M^lle M.). Sur la décomposition des matières protéiques dans les plantes *Rev. gén. Bot.*, t. XIV, 1902, p. 483.

Kiesel (A.). *Das Arginin und sein Ursprung in den Pflanzen.* Moscou, 1916.

Kjeldahl (G.). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschr. f. analyt. Chem.*, t. XXII, 1883, p. 366.

Knoop (F.). Ueber den physiologische Abbau der Säuren und die Synthese einer Aminosäure im Tierkörper. *Zeitschr. physiol. Chemie*, t. LXVII, 1910, p. 489.

Knoop (F.) u. Kertess (E.). Das Verhalten von α-Aminosäuren und α-Ketonsäuren im Tierkörper. *Zeitschr. physiol. Chemie*, t. LXXI, 1911, p. 252.

Kny (L.). Die physiologische Bedeutung der Haare von *Stellaria media. Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XXVII, 1909, p. 132

Koch (W.). Die Bedeutung der Phosphatide (Lecithane) für die lebende Zelle. *Zeitschr. f. Phys. Chem.*, t. LXIII, 1909, p. 433.

Kövessi (Fr.). Sur la prétendue utilisation de l'azote de l'air par certains poils spéciaux des plantes. *C. R. Ac. Sc. Paris.* t. CIL, 1909, p. 56.

KOSSEL (A.). *Untersuchungen über die Nucleine.* Strasbourg, 1881.

KOSSOWITCH (P.). 1. — Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf? *Bot. Ztg.*, t. XXX, 1892, p. 697.

2. — Untersuchungen über die Frage ob die Algen freien Stickstoff fixiren. *Bot. Zeitg.*, t. V, 1894, p. 98.

KOVCHOFF (J.). Influence des blessures sur la formation des matières protéiques non digestibles dans les plantes. *Rev. gén. Bot.*, t. XIV, 1902, p. 449.

KRÜGER (W.) u. SCHNEIDEWIND. Sind niedere chlorophyllgrüne Algen imstande den freien Stickstoff der Atmosphäre zu assimilieren und den Boden an Stickstoff zu bereichern ? *Landw. Jahrb.*, t. XXIX, 1900, p. 771.

LAURENT (Em.). 1. — Nutrition azotée de la levure. *Ann. Inst. Pasteur*, t. III, 1889, p. 362.

2. — Observations sur le développement des nodosités radicales chez les Légumineuses. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXXXIII, 1901, p. 1241.

LAURENT et MARCHAL. *Recherches sur la synthèse des substances albuminoïdes par les végétaux.* Bruxelles, 1903.

LAWES a. GILBERT. The sources of the nitrogen of our Leguminous Crops. *Journ. Roy. Agric. Soc.*, 3e série, t. II, p. 657.

LAWES, GILBERT et PUGH. On the sources of nitrogen of vegetation. *Philos. trans.*, t. II.

LECLERC DU SABLON. *Traité de physiologie végétale et agricole.* Paris, 1911.

LEFÈVRE (J.). Sur le développement des plantes à chlorophylle à l'abri du gaz carbonique de l'atmosphère dans un sol amidé, à dose non toxique. *Rev. gén. Bot.*, t. XVIII 1906, p. 145.

LUTZ (L.). 1. — *Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique.* Thèse, Paris, 1898.

LUTZ (L.). 2. — *Les microorganismes fixateurs d'azote.* Thèse de Pharmacie, Paris, 1904.

3. — Sur l'emploi de la leucine et de la tyrosine comme sources d'azote pour les végétaux. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXL, 1905, p. 380.

MAMELI (E.) et POLACCI (G.). Su l'assimilazione diretta dell'azoto atmosferico libero nei vegetali. *Ann. Inst. Bot. Pavia*, t. XV, 1911, p. 159.

MARCHAL (Em.). Influence des sels minéraux nutritifs sur la production des nodosités chez le Pois. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXXXIII, 1901, p. 1032.

MAZÉ (P.). 1. — Les microbes des nodosités des Légumineuses. *Ann. Instit. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 128 et t. XIII, 1899, p. 145.

2. — *Évolution du carbone et de l'azote.* Paris, Coll. *Scientia.*

MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.). L'azote titrable par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, t. III, 1921, p. 105.

MIQUEL 1. — Sur le ferment soluble de l'urée. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXI, p. 890, p. 397.

2. — Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. *Ann. microgr.*, t. V, 1893, p. 371.

MIRANDE (M.). Procédé rapide pour la recherche des plantes à acide cyanhydrique. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CIL, 1909, p. 140.

MOLISCH (H.). *Mikrochemie der Pflanze.* Jena, 1913.

MOLLIARD (M.). 1. — La valeur alimentaire de l'asparagine et de l'urée vis-à-vis du Radis. *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. LVI, 1909, p. 534.

2. — Utilisation par les plantes supérieures de certaines substances organiques azotées. *Bull. Soc. bot. Fr.* t. LVII, 1910, p. 541.

3. — Action de divers polyuréides et de l'acide hippurique sur le développement et la tubérisation du Radis *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CLIII, 1911, p. 958.

Molliard (M.). 4. — L'azote libre et les plantes supérieures. *Rev. gén. Bot.*, t. XXVIII, 1916, p. 225.

5. — Sur le dégagement d'oxygène provenant de la réduction des nitrates par les plantes vertes. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CLXIII, 1916, p. 371.

6. — Influence de la nature de l'aliment azoté sur les échanges gazeux. *Rev. gén. Bot.*, t. XXXV, 1923, p. 6.

Montemartini (L.). La fissazione dell'azoto atmosferico durante la decomposizione delle foglie cadute dagli alberi. *Staz. sperim. agr. ital.*, t. XXXVIII, 1905, p. 1060.

Müntz (A.). Sur les ferments chimiques et physiologiques. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. LXXX, 1873. p. 1250.

Müntz (A.) et Lainé (E.). 1. — Recherches sur la nitrification intensive. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. CXLI, 1905, p. 86.

2. — Rôle de la matière organique dans la nitrification *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. CXLII, 1906, p. 430.

3. — Recherches sur la nitrification intensive et l'établissement des nitrières à haut rendement. *Ann. Inst. agron.*, 2e série, t. VI, 1907, p. 15.

Nobbe (F.) u. Hiltner (L.). Wodurch werden die Knöllchen besitzenden Leguminosen befähigt den freien atmosphärischen Stickstoff für sich zu verwerten ? *Landw. Versuchsstat.*, t. XLII, 1893, p. 459.

Nobbe (F.) u. Hiltner (L.). 1. — Bodenimpfung mit Knöllchen-Bacterien für die Kultur von Leguminosen. *Naturw. Ges. Dresden*, 1897.

2. — Künstliche Ueberführung der Knöllchenbacterien von Erbsen in solche von Bohnen. *Cbl. Bakter*, 2, t. VI, 1900, p. 449.

Nobbe (F.), Schmidt (E.), Hiltner (L.) u. Hotter (E.). Versuche über die Stickstoff-assimilation der Leguminosen. *Landw Versuchsst.*, t. XXXIX, 1891, p. 327.

Osborne (Th.). *The vegetable proteins.* Londres, 1912.

Overton. *Studien über die Narkose.* Jena, 1901.

PALLADINE (W.). 1. — Die Einwirkung des Sauerstoffs auf den Eiweissabbau in Pflanzen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, 888, p. 205.

2. — Recherches sur la corrélation entre la respiration des plantes et les substances azotées actives. *Rev. gén Bot.*, t. VIII, 1896, p. 225.

3. — Influence de la lumière sur la formation des matières protéiques actives et sur l'énergie de la respiration des parties vertes des végétaux. *Rev. gén. Bot.*, t. XI, 1899, p. 81.

4. — *Pflanzenphysiologie*. Trad. allem., Leipzig, 1911.

5. — Zur Kentniss der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweissabbau und Atmung der Pflanzen. *Biochem. Zeitschr.*, t. XLIV, 1912, p. 318.

PECHE (K.). Mikrochemischer Nachweis der Cyanwasserstoffsäure in *Prunus Laurocerasus L. Sitzber. d. Kais. Ak. Wiss. Wien*, t. CXXI, 1912, p. 33.

PFEFFER (W.). 1. — Untersuchungen über die Proteïnkorner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. *Jahrb. wiss. Bot.*, t. VIII, 1872, p. 429.

2. — *Physiologie végétale*. Trad. fr. Friedel, 1905.

PICTET (A.). *Die Pflanzenalkaloide und ihre chemische Konstitution*. Berlin, 1900.

POSTERNAK (S.). 1. — Sur le premier produit d'organisation de l'acide phosphorique dans les plantes à chlorophylle, avec quelques remarques sur le rôle physiologique de l'inosite. *Rev. gén. Bot.*, t. XII, 1900, p. 5.

2. — Sur la matière phospho-organique de réserve des plantes à chlorophylle. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXXXVII, 1903, pp. 202, 307 et 439.

PRANTL. Die Assimilation freien Stickstoffs und der Parasitismus von *Nostoc. Hedwigia*, t. XXVIII, 1889, p. 135.

PRAZMOWSKI (A.). Die Wurzelknöllchen der Erbse. *Landw. Versuchsstat.*, t. XXXVII, 1890, p. 161.

PRIANICHNIKOW (D.). Zur Frage der Asparaginbildung. *Ber. d bot. Ges.*, t. XXII, 1904, p. 35.

PRIANICHNIKOW (D.) u. SCHULOW (J.). Ueber die synthetische Asparaginbildung in den Pflanzen. *Ber. d. bot. Ges.*, t. XXVIII, 1910, p. 253.

PRIANICHNIKOW (D.-N.). 1. — La synthèse des corps amidés aux dépens de l'ammoniaque absorbée par les racines *Rev. gén. Bot.*, t. XXV, 1913, p. 5.

2. — Sur le rôle de l'asparagine dans les transformations des matières azotées chez les plantes. *Rev. gén. Bot.*, t. XXXVI, 1924, p. 108.

PRUCHA (M.-J.). Physiological studies of *Bacillus radicicola* of Canada field pea. *Cornell Univ. Agr. exp. Stat.*, mém. 5, 1915.

RAULIN. *Etudes chimiques sur la végétation*. Thèse, Paris, 1870. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 5e série, t. XI, 1869.

SACHSSE (R.). Ueber eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Asparagins. *Journ. f. prakt. Chem.*, t. VI, 1872, p. 118.

SCHLŒSING (Th.) et MÜNTZ (A.). Sur la nitrification par les ferments organisés. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. LXXXIV, 1877, p. 301 et t. LXXXV, 1877, p. 1018.

SCHLŒSING FILS et LAURENT (E.). Recherches sur la fixation de l'azote libre par les plantes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, 1892, p. 65.

SCHLŒSING (Th.) FILS. 1. — L'argon et la végétation. *C. R. Ac. Sc. Paris*, 8 nov. 1897.

2. — Contribution à l'étude de la nitrification. *C. R. Ac. Paris*, 22 nov. 1897.

3. — Nitrates et nitrites pour engrais. *C. R. Ac. Sc. Paris*, t. CXLI, 1905, p. 745.

SCHRAMM (J.-R.). The relation of certain Grass Green Algæ to elementary Nitrogen. *Ann. Bot. Gard.*, t. I, 1914, p. 2.

SCHRYVER (Ph.-D.). *The general characters of the proteins*. Londres, 1913.

SCHULOW (J.-S.). *Physiologische Forschungen*. Moscou, 1913.

SCHULZE (E.). 1. — Ueber den Eiweissumsatz und die Bildungsweise des Asparagins und des Glutamins in den Pflanzen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, t. XXVI, 1896, p. 411.

2. — Ueber die Verbreitung des Glutamins in den Pflanzen. *Landw. Versuchsstat.* t. XLVIII, 1897, p. 33.

3. — Ueber den Umsatz der Eiweisstoffe in der lebenden Pflanze. *Zeitschr. physiol. Chem.*, t. XXIV, 1898, p. 18.

4. — Ueber die Argininbildung in den Keimpflazen von *Lupinus luteus*. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XXII, 1904, p. 381.

SCHULZE (E.), STEIGER (E.) u. BOSSHARD (E.). Untersuchungen über die Stickstoffhaltigen Bestandteile einiger Rauhfutterstoffe. *Landw. Versuchsstat.*, t. XXXIII, 1887, p. 89

SCHULZE (E.) u. WINTERSTEIN (E.). *Ergebnisse der Physiologie*, t. I, 1902, p. 35.

2. — Phosphatide. *Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden*, t. II, 1909, p. 256.

SMIRNOW (A.-I.). 1. — Einwirkung der Kohlehydrate auf den Stickstoffumsatz bei höheren Pflanzen. *Ber. d. landw. Akad. Moskau*, 1918.

2. — Ueber die Synthese der Säureamide in den Pflanzen bei Ernährung mit Ammoniaksalzen. *Biochem. Zeitschr.*, t. CXXXVII, 1923, p. 1.

SOAVE (M.). 1. — Sulla funzione fisiologica dell'acido cianidrico nelle piante. *Ann. Pharmacoter. e chim.*, 1898, p. 481.

2. — *Chimica vegetale e agraria*, 2 vol., Turin, 1916.

SPATZIER (W.). Ueber das Auftreten und die physiologische Bedeutung des Myrosins in der Pflanze. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXV, 1893, p. 39.

STOKLASA (J.). 1. — Ueber die Entstehung und Umwandlung des Lecithins in der Pflanze. *Zeitschr. physiol. Chemie*, t. XXV, 1898, p. 398.

2. — Biochemischer Kreislauf des Phosphat-Ions in Boden. *Centrbl. f. Bakteriol.* 2, t. XXIX, 1911.

STUTZER. Vorkommen von Nuclein in den Schimmelpilze und in der Hefe. *Zeitschr. physiol. Chem.*, t. VI, 1882, p. 572.

SUSUKI (U.). Ueber die Assimilation der Nitrate in Dunkelheit durch Phanerogamen. *Bot. Cbl.*, t. LXXV, 1898 p. 289.

THOMAS (P.). *Recherches biochimiques sur les protéiques de la Levure.* Thèse, Paris, 1919.

TIEGHEM (Ph. Van). *Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique.* Thèse, Paris, 1864.

TISCHUTKIN (N.). Die Rolle der Bakterien bei der Verânderung der Eiweisstoffe auf den Blättern von Pinguicula. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 346.

TREUB (M.). 1. — Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* Reinw. *Ann. Jard. bot. Buitenzorg*, t. XIII, 1896, p. 1.

2. — Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes. *Ann. jard. bot. Buitenzorg*, 2e série, t. IV, 1905, p. 86.

VERSCHAFFELT (E.). On the prussic acid in the opening buds of *Prunus. Konink. Ak. Wetens. Amsterdam*, 1902, p. 31.

VILLE (G.). *Recherches expérimentales sur la végétation.* Paris, 1868.

VINES (S.-H.). 1. — The proteolytic Enzymes of *Nepenthes. Ann. of. Bot.*, t. II, 1897, p. 563, t. XII, 1898, p. 545, t. XV, 1901, p. 563.

2. — Proteolytic Enzymes in Plants. *Ann. of Bot.*, t. XVII, 1903, p. 237.

3. — The Proteases of Plantes. *Ann. of. Bot.*, t. XVIII, 1904, p. 289, t. XIX, 1905, p. 149, t. XX, 1906, p. 113.

WAGNER (P.). 1. — *Ergebnisse von Düngungsversuchen in Lichtdruckbildern*, 2e éd., 1891.

2. — *Düngungsfragen*, t. IV, 1910.

WANN (F.-B.). The fixation of nitrogen by green Plants. *Amer. Journ. Bot.*, t. VIII, 1921, p. 1.

WEEVERS (Th.). Die physiologische Bedeutung des Kaffeïns und des Theobromins. *Ann. Jard. bot. Buitenzorg*, 2e série, t. VI, 1907, p. 1 et t. IX, 1910, p. 18.

WHELDALE (M.). *Practical Plant Biochemistry*. Cambridge Univ. Press, 1920.

WILSON (J.-K.). Physiological Studies of *Bacillus radicicola* of Soybean *(Soja max.)* and of factors influencing nodule production. *Cornell Univers. agric. exp. Stat.*, Bull. 386, 1917.

WINOGRADSKY (S.). 1. — Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur*, t. IV, 1890 et t. V, 1891.

2. — Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les microbes. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. CXVI, 1893, p. 1385.

3. — Absorption par les microorganismes de l'azote libre de l'air. (*Arch. de l'Inst. de méd. expérim. de Saint-Pétersbourg*, t. III, 1895.)

4. — Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. *Arch. Sc. biolog. Inst. imp. Saint-Pétersbourg*, t. III, 1895, p. 297.

WINTERSTEIN (E.) u. TRIER (G.). *Die Alkaloide*. Berlin, 1910.

ZEMPLEN (G.). Ueber die Verbreitung der Urease bei höheren Pflanzen. *Zeitschr. physiol. Chem.*, t. LXXIX, 1912, p. 229.

ZEMPLEN (G.) et ROTH (J.). Adatok an erdei faknitrogen felvetelchen. *Erdeszeti Kiserletek*, 1908.

ZALESKI (W.). 1. — Zur Keimung der Zwiebeln von *Allium Cepa* und Eiweissbildung. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XVI, 1898, p. 146.

2. — Les conditions de la formation des protéines dans les plantes [Russe] Kharkow, 1900. Anal. *Bot. Cbl.*, t. LXXXVII, 1901, p. 277.

3. — Beiträge zur Kentniss der Eiweissbildung in den Pflanzen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XIX, 1901, p. 377.

4. — Beiträge zur Verwandlung des Eiweissphosphors in den Pflanzen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XX, 1902, p. 426, t. XXV, 1907, p. 349.

Zaleski (W.). 5. — Beiträge zur Kentniss der Eiweissbildung in reifenden Samen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XXIII, 1905, p. 126.

6. — Autolytische Ammoniakbildung in den Pflanzen *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XXV, 1907, p. 357.

7. — Beiträge zur Pflanzenatmung. *Ber. d. d. bot. Ges.*, t. XXIX, 1911, p. 349.

8. — Zur Kentniss der Stoffwechselprozesse in reifenden Samen. I. Ueber den Umsatz der Stickstoffverbindungen. *Beih. z. Bot. Cbl.*, t. XXVII, 1911, p. 63.

Zimmermann (A.). 1. — Ueber die Proteïnkrystalloïde. *Beitr. z. Morph. u. Physiol. der Pflanzenzelle*, 1887, p. 54, t. I, 1887, p. 54 et 112, t. II, p. 1.

2. — *Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkerns*. Jena, 1896.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE XIII

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. — **Substances protéiques et leurs dérivés chez les végétaux supérieurs** 7

1. **Propriétés générales des protéines** 7

2. **Propriétés physiques** 9

3. **Propriétés chimiques** 13

4. **Classification des protéines végétales** 18

A. Protéines simples 18

Albumines 19

Globulines 20

Glutélines et prolamines 22

Localisation, caractères histologiques 25

B. Protéines simples dérivées ; produits de décomposition 37

Acides aminés 39

Polypeptides 53

C. Protéines conjuguées 56

Nucléoprotéides. Bases xanthiques 56

Glycoprotéides 61

Substances protéiques chez les Thallophytes 61

CHAPITRE II. — **Nutrition azotée des végétaux supérieurs** 65

1. **Différentes sources d'azote** 65

A. Azote ammoniacal 66

B. Azote nitrique 74

C. Azote organique 88
D. Azote libre 95
2. **Formation des substances protéiques** 107

CHAPITRE III. — **Nutrition azotée des végétaux hétérotrophes** 126
1. **Azote combiné** 126
2. **Azote libre** 130
A. Microorganismes des Légumineuses 130
B. Bactéries du sol 147
C. Mucédinées et Algues 157

CHAPITRE IV. — **Digestion des substances protéiques** 165
1. **Diastases protéolytiques des Bactéries et des Champignons** 165
2. **Diastases protéolytiques des végétaux supérieurs** .. 170
3. **Plantes carnivores** 181

CHAPITRE V. — **Transformations et rôle des substances azotées** 202
1. **Les substances azotées dans le phénomène respiratoire** 202
2. **Rôle des substances azotées dans la fermentation alcoolique** 207
3. **Fermentations des substances azotées** 209
A. Putréfaction des substances protéiques 210
B. Fermentation ammoniacale 211
C. Dégagement d'azote gazeux dans la fermentation des matières azotées 218
D. Nitrification 221
Conditions 224
Cause 226
Isolement des bactéries 228
Ferments nitreux 232
Ferments nitriques 236
La nitrification dans le sol 237
E. Dénitrification 244
Cycle de l'azote 251

CHAPITRE VI. — **Substances azotées non protéiques** 254

1. **Glucosides azotés non cyanogénétiques**..... 254
2. **Acide cyanhydrique et composés cyanogénétiques.** 257

Amygdaline 258
Autres glucosides cyanogénétiques 262
Glucosides azotés et sulfurés 264
Signification physiologique 266

3. **Alcaloïdes**..... 272

Signification physiologique 284

4. **Lipoïdes azotés et phosphorés**..... 290

Phosphatides 291
Cycle du phosphore..... 296

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE..... 301

ÉVREUX. — IMPRIMERIE HENRI DÉVÉ

429
P

Bot.
M.
Author Molliard, Marin
Title Nutrition de la plante.
222786

University of Toronto
Library

DO NOT
REMOVE
THE
CARD
FROM
THIS
POCKET

Acme Library Card Pocket
Under Pat. "Ref. Index File"
Made by LIBRARY BUREAU